

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|---|--|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation⁶ : A61K 31/35, 9/107 | | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/11889 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. März 1998 (26.03.98) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH97/00168 (22) Internationales Anmeldedatum: 28. April 1997 (28.04.97) | | (81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (30) Prioritätsdaten: PCT/CH96/00323 18. September 1996 (18.09.96) CH | | Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> | |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MARGEN S.A. [CH/CH]; c/o Eugster Carl, Hackbergstrasse 40, CH-4125 Riehen (CH). | | | |
| (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EUGSTER, Carl [CH/CH]; Hackbergstrasse 40, CH-4125 Riehen (CH). EUGSTER, Conrad, Hans [CH/CH]; Herrengütlstrasse 18, CH-8304 Wallisellen (CH). | | | |
| (74) Gemeinsamer Vertreter: MARGEN S.A.; c/o Eugster Carl, Hackbergstrasse 40, CH-4125 Riehen (CH). | | | |
| (54) Title: ULTRAMICROEMULSIONS FROM SPONTANEOUSLY DISPERSIBLE CONCENTRATES WITH ANTITUMOR, ANTIVIRAL, VIRUCIDE AND ANTIPARASITICALLY ACTIVE ESTERS OF BIOFLAVONOID COMPOUNDS | | | |
| (54) Bezeichnung: ULTRAMIKROEMULSIONEN AUS SPONTAN DISPERGIERBAREN KONZENTRATEN MIT ANTITUMORAL, ANTIVIRAL, VIRUZID UND ANTIPARASITÄR WIRKSAMEN ESTERN VON BIOFLAVONOID-VERBINDUNGEN | | | |
| (57) Abstract This invention concerns spontaneously dispersible concentrates of esters with antitumor, antiviral, virucidal and antiparasitic effect which are made from bioflavonoid compounds, aqueous ultramicroemulsions out of such concentrates, new esters of selected bioflavonoid compounds, processes for producing and preparing them, and their use as agents for producing medicaments effective against viral and parasitic illnesses, against tumors, eczema and psoriasis, for ongoing tumor prophylaxis and for enhanced absorption of exogenic activators, metabolic modulators and regulators. | | | |
| (57) Zusammenfassung Spontan dispergierbare Konzentrate mit antitumoral, antiviral, viruzid und antiparasitär einsetzbaren Estern von Bioflavonoid-Verbindungen, wässrige Ultramikroemulsionen aus solchen Konzentraten, neue Ester von ausgewählten Bioflavonoid-Verbindungen, Verfahren zu ihrer Herstellung und Aufbereitung, sowie ihre Verwendung als Mittel zur Herstellung von Heilmitteln mit Wirksamkeit gegen virale und parasitäre Erkrankungen, gegen Tumore, Ekzeme und Psoriasis, zur anhaltenden Tumor-Prophylaxe und zur verstärkten Aufnahme von exogenen Aktivatoren, metabolischen Modulatoren und Regulatoren werden beschrieben. | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Uzbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

**ULTRAMIKROEMULSIONEN aus
SPONTAN DISPERGIERBAREN KONZENTRATEN
mit ANTITUMORAL, ANTIVIRAL, VIRUZID und ANTIPARASITÄR
WIRKSAMEN ESTERN von BIOFLAVONOID-VERBINDUNGEN**

EINLEITUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft Ultramikroemulsionen aus spontan dispergierbaren Konzentraten mit lipophilen, aliphatischen Estern von ausgewählten, natürlich vorkommenden Flavonoiden (ohne Anthocyanine und Chalcone), neue Ester dieser Verbindungen, Verfahren zu ihrer Herstellung und Aufarbeitung, die Verwendung der Ester-haltigen, spontan dispergierbaren Konzentrate zur Herstellung von Heilmitteln mit antitumoraler, antiviraler, direkt viruzider und/oder antiparasitärer Wirksamkeit, zur Bekämpfung von Ekzemen und Psoriasis, sowie zur Tumorprophylaxe und Tumortherapie, wie auch zur verstärkten Aufnahme von exogenen Aktivatoren, metabolischen Modulatoren und Regulatoren.

Die Ester dieser Bioflavonoid-Verbindungen haben überraschenderweise eine sehr gute antitumorale, antivirale, direkt viruzide, sowie teilweise auch eine antiparasitäre Wirkung, und sie eignen sich auch zur Behandlung von Ekzemen und Psoriasis und zur Stimulierung von Immunantworten. Die therapeutischen Eigenschaften derartiger Ester treten dann bedeutend verstärkt auf, wenn sie in spontan dispergierbare Konzentrate eingearbeitet und darauf mit destilliertem Wasser oder 5%-Glucoselösung oder auch mit physiologischer Kochsalzlösung (Ringerlösung) verdünnt worden sind, wobei sich thermodynamisch stabile Ultramikroemulsionen ergeben, mit Mizellen von einem hydrodynamischen Radius von 2.2 bis 3.0 nm.

Die stark erhöhte, anhaltende *biologische Wirksamkeit* der neuen Flavonoidperester und ihrer Darreichung in erfindungsgemässer Konzentrat- und Ultramikroemulsionsform stützt sich auf folgende Faktoren:

- die Veresterung der ausgewählten Flavonoide mit mittel- und langkettigen Fettsäuren führt zu einer ausserordentlich gesteigerten *Lipophilie* und damit zu einer Inversi n der ursprünglichen Eigenschaft der Grundkörper. Zusammen mit der massgeblichen Anhebung des Wanderungs- und Spreitungs-

-- 2 --

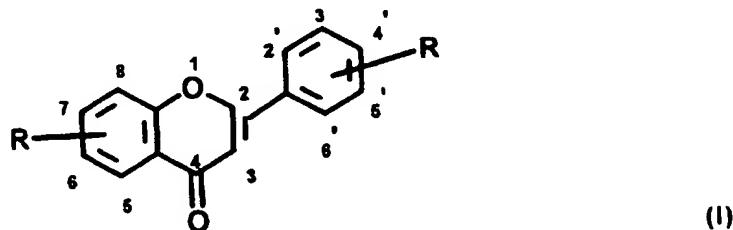
vermögens der ultrafinen Mizellen bewirkt dies eine rasche Permeation von hydr phoben Membranen;

- die Flavonoidperester sind als "aktivierte Ester" zu betrachten. Sie haben die Fähigkeit, Acylgruppen auf geeignete nucleophile Gruppen zu übertragen, was insbesondere auf die Acylgruppe an C-5 des Flavonoid-Grundgerüstes zutrifft. Diese Aktivierung ist bei Verwendung von solvolytischen Lösungsmitteln leicht in 1H-NMR-Spektren zu erkennen: die typische Wasserstoffbrücke zwischen OH-C-5 und dem Carbonyl an C-4 tritt bei ca. 12-13 ppm rasch in Erscheinung. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Acylierung von (R)₃-C-SH-, R-CH₂OH- und R-NH₂-Gruppen, sowie eventuell auch von sekundären Alkoholen und sekundären Aminen, welche in den Zellkomponenten vorhanden sind, rasch erfolgen dürfte;
- die Freisetzung der intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen OH-C-5 und dem Carbonyl an C-4 an geeigneter Stelle der Zelle eröffnet das inhärente Chelierungspotential der Flavonoide für verschiedene Kationen mit den Koordinationszahlen 4 und 6. Seit altersher wurde dieser Umstand der starken Chelierung von Kationen in wässrigem Milieu zum Färben von Cellulosegeweben (Hanf, Flachs, Baumwolle, usw.) ausgenutzt;
- die Labilität, vorab der C-5-Acylgruppe, verbietet die Aufarbeitung der Veresterungsansätze mit wässrigen Basen, wie auch die Säulenchromatographie an Materialien mit nucleophilen Haftstellen. Die Veresterung muss demnach mit einem Minimum an Reinigungsschritten durchgeführt werden.

BESCHREIBUNG der Erfindung

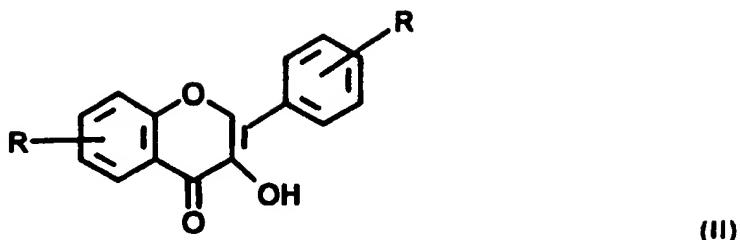
Die Ester von Bioflavonoidverbindungen haben als Grundkörper die allgemeinen Formeln (I) bis (IV):

Flavone:

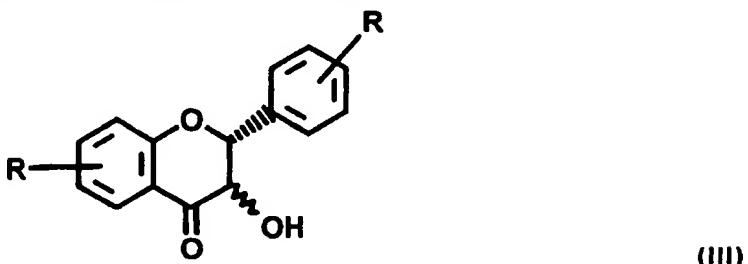


R = OH, OCH₃, in verschiedenen Stellungen, wie z.B. Chrysin mit OH an (C-5,7) oder Apigenin mit OH an (C-5,7,4')

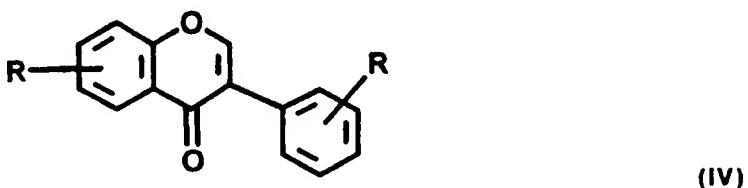
-- 3 --

Flavone:

mit R wie oben, z.B. Kämpferol mit OH (C-5,7,4'), Quercetin mit OH (C-5,7,3',4'), Morin mit OH (C-5,7,2',4'),

Flavanole (2,3-Dihydroflavanole):

mit R wie oben, z.B. (+)-Catechin mit OH (C-5,7,3',4')

Isoflavonole:

mit R wie oben, z.B. Genistein mit OH (C-5,7,4')

wobei in den Formeln (I) bis (IV) R für Hydroxyl, eine C₆₋₃₁-Alkyl-, eine C₉₋₃₁-Alkenyl- oder eine C₉₋₃₁-Alkapolyengruppe steht.

Die Veresterung der genannten Grundkörper kann nach einem an sich bekannten Verfahren vorgenommen werden:

Bildung des Chlorides einer Verbindung der Formel (V) :



worin R¹ für eine C₆₋₃₁-Alkyl-, eine C₉₋₃₁-Alkenyl- oder eine C₉₋₃₁-Alkapolyengruppe steht, mit einem Chlorierungsmittel, wie z.B. Thionylchlorid oder Oxalylchlorid, und anschliessende Umsetzung mit einer Verbindung der Formeln (I) bis (IV) bei einer Temperatur von 0 bis 60°C, unter Schutzgaszuleitung, in einem indifferenten Lösungsmittel, wie z.B. Toluol oder Tetrahydrofuran, und

-- 4 --

in Gegenwart eines Katalysators, wie z.B. Dimethylformamid und/oder p-Dimethylamin pyridin.

Die Ester der Bioflavonoid-Verbindungen gemäss den Formeln (I) bis (IV) haben überraschenderweise eine ausgezeichnete antitumorale, antivirale, viruzide, sowie auch antiparasitäre Wirkung, und sie eignen sich überdies zur Bekämpfung von Ekzemen und von Psoriasis und zur Ausgleichung metabolischer Störungen. Diese Wirkungen treten vornehmlich dann ein, wenn sie in erfindungsgemäss, spontan dispergierbare MARIGENOL®-Konzentrate eingearbeitet worden sind, welche mit destilliertem Wasser, 5%-iger Glucoselösung oder auch Ringerlösung verdünnt, thermodynamisch stabile Oel-in-Wasser Ultramikroemulsionen ergeben.

Derartige Ultramikroemulsionen weisen kugelförmige Mizellen mit einem hydrodynamischen Radius auf von 2.2 bis 3.0 nm. [Messungen mit QLS = quasi-elastischer, dynamischer Lichtstreuung wurden durchgeführt an der E.T.H., Zürich, Institut für Polymere (Prof.Dr. Pier Luigi LUISI und Prof.Dr. Peter SCHURTERBERGER)].

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind vorab spontan dispergierbare Konzentrate mit antitumoral, antiviral, viruzid oder antitrypanosomal wirksamen Estern der Formeln (I) bis (IV). Diese Ester sind nahezu wasserunlösliche und hoch agglomerierte Verbindungen. Damit solche Verbindungen aber durch die Membranbarrière der Tumor-, bzw. Wirtzellen oder auch durch die Proteinhülle von Viren diffundieren und im Innern der Zelle, bzw. des Virus wirksam werden können, müssen sie zuvor in geeigneter Weise im wässrigen Medium solubilisiert worden sein. Im Wege der Bildung von spontan dispergierbaren Konzentraten und daraus hergestellten, thermodynamisch stabilen Oel-in-Wasser Ultramikroemulsionen gelingt es, einen optimalen Solubilisierungsgrad der neuen Ester zu erzielen. Dazu werden einerseits ausgewählte Cotenside oder Lösungsvermittler und anderseits geeignete, oberflächenaktive Verbindungen (Tenside) eingesetzt und zu einem ausgewogenen System vereinigt und dann verdünnt.

Alle experimentellen Beobachtungen an dergestalt ausgebildeten, wässrigen Ultramikroemulsionen lassen sich einheitlich durch die Annahme deuten, dass die ausgewählten Cotenside und Tenside in der wässrigen Phase organisierte Aggregate, sog. Mizellen bilden. Diese besitzen mehr oder weniger kugelförmige Gestalt, mit einem hydrodynamischen Radius von 2.2 bis 3.0 nm. Die Tensid und die Hydr tr pe (C tenside) lassen zwischen der äusseren, wässrigen Phase und der innen, ölichen Phase der Mikroemulsion

-- 5 --

[enthaltend einen Ester der Formeln (I) bis (IV), gelöst im biot nsiden Lösungsvermittler] eine Grenzschicht entsteht, wodurch die Durchmischung dieser beiden Phasen unterbleibt. In der ölichen, inneren Phase der Mizellen, dem Mizellaren Kern, liegen dann die Moleküle des Bioflavonoid-Esters in monomerer oder in oligomer agglomerierter Form vor.

Die Mizellen der Inneren Phase derartiger Ultramikroemulsionen sind demnach an ihrer Oberfläche mit einem elastischen Tensidmantel geschützt, was sie instand setzt, leicht durch die Zellmembran ins Innere der Tumor- oder Wirtzelle, bzw. durch die Proteinhülle von Viren zu diffundieren. Die Diffusion durch die Plasmamembran von Tumor- oder Wirtzellen oder durch das Capsid von Viren erfolgt ausschliesslich aufgrund thermischer Molekularbewegungen.

Die Richtung, die ein konkreter Diffusionsvorgang einschlägt, wird vom Konzentrationsunterschied bestimmt, welcher an der Plasmamembran zwischen ausserhalb und innerhalb der Tumor- oder Wirtzelle, bzw. an der Proteinhülle besteht. Die Diffusion verläuft solange entlang dem Konzentrationsgefälle, bis es abgebaut ist. Zwischen der extrazellulären Zone und dem Inneren der einzelnen Tumor- oder Wirtzelle oder eines Virus wird die Konzentration an Wirksubstanz, bzw. eines Wirkstoffsystems ausgeglichen, wobei auch verzögerte Abgabeeffekte auftreten können. Derartige Diffusionsvorgänge verlaufen unabhängig von jeglicher Energiezufuhr. Sie haben keinen Bezug auf die zelluläre Stoffwechselenergie.

Die Geschwindigkeit des Diffusionsvorganges, bzw. die Stärke des Wirkstoff-transportes durch die Membran der Tumor- oder Wirtzelle werden bestimmt:

1. vom Konzentrationsunterschied in den beiden Kompartimenten
2. vom Teilchenradius des diffundierenden Wirkstoffmoleküls oder Wirkstoffsystems
3. von der Viskosität der diffundierenden, wässrigen Lösung (Emulsion)
4. von der Temperatur.

Wie aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich ist, hat eine globuläre "Mizelle" mit einem hydrodynamischen Radius von einem Centimeter ein Volumen von $4,189 \text{ cm}^3$ und eine Phasenoberfläche von $12,564 \text{ cm}^2$.

Demgegenüber weisen 1018 Mizellen mit einem hydrodynamischen Radius von nur 10^{-6} cm (10 nm), welche zusammen das gleiche Volumen von $4,189 \text{ cm}^3$ ausmachen, schon eine Gesamt-Phasenoberfläche von $1'256,4 \text{ m}^2$ auf.

-- 6 --

MIZELLEN: VERHÄLTNIS VOLUMEN ZU GESAMTOBERFLÄCHE

| ZAHL der MIZELLEN | Hydr. dyna- mischer RADIUS der Mizellen | VOLUMEN der Mizell n | GESAMT- OBERFLÄCHE der Mizellen |
|-------------------|---|-----------------------|---------------------------------|
| 1 | 1 cm | 4,189 cm ³ | 12,564 cm ² |
| 10 ³ | 0,1 cm = 1 mm | " | 125,64 cm ² |
| 10 ⁶ | 0,01 cm | " | 1'256,4 cm ² |
| 10 ⁹ | 0,001 cm | " | 12'564 cm ² |
| 10 ¹² | 0,0001 cm = 1 mm = 1'000 nm | " | 125'640 cm ² |
| 10 ¹⁵ | 0,00001 cm = 100 nm | " | 1'256'400 cm ² |
| 10 ¹⁸ | 10 ⁻⁶ cm = 10 nm | " | 1'256,4 m ² |
| 10 ²¹ | 10 ⁻⁶ mm = 1 nm | " | 12'564 m ² |

$$\text{Kugelvolumen} = \frac{4}{3} \pi r^3$$

$$\text{Kugeloberfläche} = 4 \pi r^2$$

Fazit: Durch die grosse Phasenoberfläche, welche die Mizellen mit einem hydrodynamischen Radius von 2.2 bis 3.0 nm in Ultramikroemulsionen ausbilden, wird zusätzlich zu deren gesteigertem Diffusionsvermögen die rheologische Verteilung ("spreading") und somit die Bioverfügbarkeit und Bioaktivität der Wirkstoffe, welche im Kern der Mizellen in monomer oder oligomer agglomerierter Form vorliegen, ebenfalls stark verbessert. Deren Abgabe als Feinstmizellen kann eine beträchtliche Ermässigung der pharmakologisch kritischen Dosierung erlauben und damit unerwünschte Nebenwirkungen vermeiden oder wenigstens verringern helfen.

Die "Packungsdichte" eines spontan dispergierbaren, stabilen MARIGENOL®-Konzentrates nimmt in exponentieller Funktion mit der kleiner werdenden Teilchengrösse der Mizellen zu. Entscheidend sind die richtige Ausbildung der inneren Phase, ihr ausgewogenes Verhältnis zum Gesamtkonzentrat und die Auswahl der je dazu passenden Tenside.

Die erfindungsg mäss sp ntan dispergierbaren Konzentrate enthalten:
0,1 bis 5 Gewichts-% inz lner Ester der Form I in (I) bis (IV), bzw. eine Kom-
binati n s lcher Ester, s wie

-- 7 --

5 bis 25 Gewichts-% eines als Hydrotrop, d.h. als Coemulgat r di nenden, pharmaverträglichen Lösungsvermittlers oder Lösungsmittelgemisches,

5 bis 90 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Tensids der Tensidgemisches, sowie wahlweise

0 bis 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins,

0 bis 10 Gewichts-% eines Stabilisators, Radikalfängers oder Penetrationsverbesserers.

Die erfindungsgemäss anwendbaren Öl-in-Wasser Ultramikroemulsionen enthalten:

0,01 bis 5 Gewichts-% eines spontan dispergierbaren Konzentrates wie oben beschrieben,

85 bis 99,99 Gewichts-% destilliertes Wasser, 5%-ige Glucoselösung oder physiologische Kochsalzlösung (Ringerlösung),

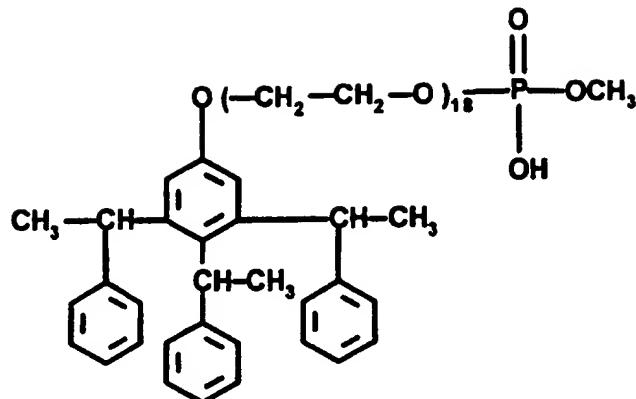
0 bis 10 Gewichts-% pharmazeutische Träger- oder Zusatzstoffe und/oder Hilfsmittel.

Solche wässrigen Ultramikroemulsionen weisen eine ermässigte Oberflächenspannung von 28 bis 32 mNm⁻¹ auf und einen niedrigen, inneren Widerstand (d.h. eine dynamische Viskosität η bei 20°C) von ca. 1.0 cP = 10⁻³ Pa.s.

Die erfindungsgemäss einzusetzenden Tenside oder Tensidgemische können anionaktiv, kationaktiv, amphoteric oder nicht-ionogen sein. Bevorzugt sind sie amphoteric oder nicht-ionogen und haben ein HLB-Verhältnis (d.h. eine "hydrophilic-lipophilic balance") zwischen 2 und 18; vorzugsweise liegt es für Gemische zwischen 2 bis 6 einerseits und 10 bis 15 anderseits. HLB-Werte geben Auskunft über die hydrophilen und lipophilen Eigenschaften eines Emulgators. Vgl. dazu "Hydrophile-Lipophile Balance: History and recent Developments" von Paul Becher im Journal of Dispersion Science and Technology 5 (1), 81-96 (1984).

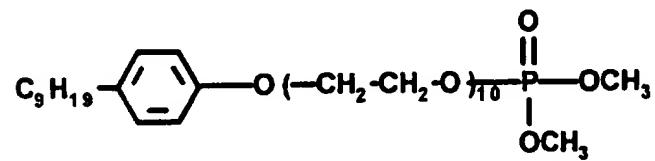
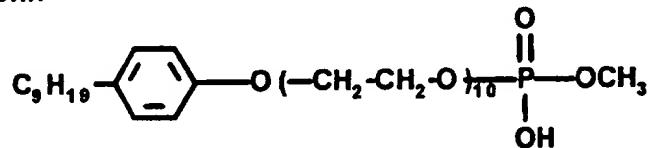
In hohem Masse bevorzugt zur Herstellung von erfindungsgemässen, spontan dispergierbaren Konzentraten sind einerseits Phosphorsäureestertenside, wie z.B.: das praktisch wasserfreie Tristyrylphenolpolyoxyethylen-18-phosphorsäureester-triethanolamin-Salz Tensid (TEA-Salz-Tensid) :

-- 8 --



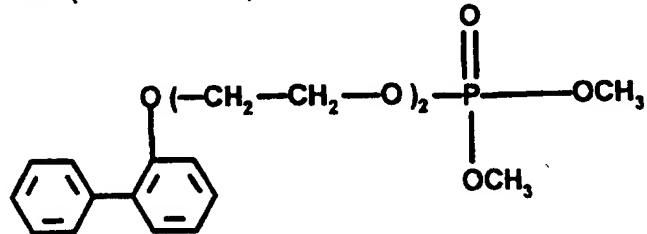
(Soprophor® FL, RHÔNE-POULENC);

Diphasol® 3873 (CIBA-GEIGY), bzw. das identische Sermul® EA 188 (SERVO), ein Mischemulgator, bestehend aus je 50 % der beiden Verbindungen mit den Formeln:



Diphasol® 3873 (CIBA-GEIGY), ein Alkylphenol Polyglycolether-Phosphat-Tensid

Tensid 508 (CIBA-GEIGY)

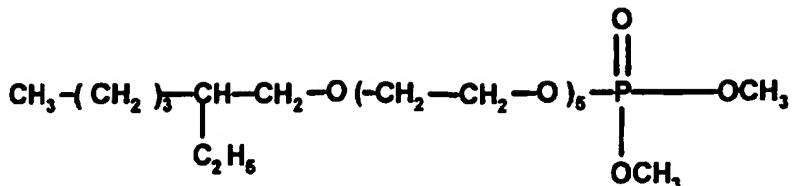


(Tensid 508, CIBA-GEIGY);

Tinovetin® JU (CIBA-GEIGY), ein Hydroxybiphenyl-10-Ethoxy-Phosphorsäureester

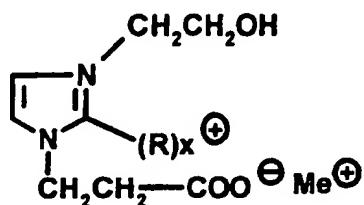
Butyl-mono-4-Ethoxy-Phosphorsäureester (Zerostat® AT, CIBA-GEIGY), bzw.

-- 9 --



(Zerostat® AN, CIBA-GEIGY)

und anderseits **Betainverbindungen**, d.h. **amphotere, salz- und wasserfreie Imidazolderivate**, wie z.B.:



worin Me^{\oplus} für Wasserstoff, Alkali- und Erdalkaliatome und R_x für C_{1-32} -Alkyl oder C_{2-32} -Alkenylgruppen stehen.

Verwendung finden auch "Polysorbate"-Verbindungen, wie z.B. Tween® 20-85 (Atlas Chem.Ind.Inc.; bzw. ICI Speciality Chemicals) und sog. "multifunctional glucose derivatives", wie z.B. Glucate® SS (Methyl-Glucose-Sesquistearat) und Glucamate® SSE-20 (PEG-20 Methyl-Glucose-Sesquistearat) von Amerchol, Edison, N.J., U.S.A.

Als **Hydrotrop**, d.h. als **Coemulgator** dienende, pharmaverträgliche Lösungsmittel lassen sich einsetzen, z.B.:

Ester eines aliphatischen Alkohols (C_{3-18}) mit einer aliphatischen Carbonsäure (C_{10-22}), wie etwa Isopropyllaurat, Hexyllaurat, Decyllaurat, Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat und Laurylmyristat; Kohlenwasserstoffe mit einer geraden Kohlenstoffkette (C_{12-32}), welche mit 6 bis 16 Methylgruppen substituiert ist und 1 bis 6 Doppelbindungen aufweisen kann, wofür Terpene wie Polymethylbutane und Polymethylbutene als Beispiele dienen mögen.

Mono-Ester aus Ethylenglykol oder Propylenglykol mit einer aliphatischen Carbonsäure (C_{6-22}), wie etwa Propylenglykolmonolaurat und Propylenglykolmonomyristat.

Ester aus einem aliphatischen Alkohol (C_{12-22}) mit Milchsäure, wie z.B. Myristyl- oder vorzugsweise Lauryl-Lactat; Mono-, Di- oder Triester des Glycerins mit einer aliphatischen Carbonsäure (C_{6-22}), wie z.B. Glyceryl-Caprylat, oder Miglyol® 812 Neutralöl (Oleum neutrale).

Ester aus einem Poly(2-7)ethylenglykiglyzerinther mit mindestens einer freien Hydroxylgruppe mit einer aliphatischen Carbonsäure (C_{6-22}), wie z.B.

-- 10 --

aliphatische Alkohole (C₁₂₋₂₂), s. mit u.a. Dodecanol, Tetradecanol, Oleyl-alkohol, 2-Hexyldecan und 2-Octyldecan.

Ester mit mindestens einer freien Hydroxylgruppe, aus Poly-(2-10)glykol mit einer aliphatischen Carbonsäure (C₆₋₂₂), Monoether aus einem Polyethylen-glykol mit einem aliphatischen Alkohol (C₁₂₋₁₈), wie z.B. Polyoxyethylen (C₁₀)-octylether.

Heterocyclische Verbindungen, wie z.B. 1-Methyl-2-Pyrrolidon.

Zwitterionische Verbindungen (Good-Puffer) wie z.B. "HEPES" mit Formel: 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure, oder "CHAPS" mit Formel: 3-[(3-Cholamido-propyl)-dimethyl-ammonio]-propansulfonat oder

Biotenside Terpinelester der allgemeinen Formel (VI) :



worin R² eine aliphatische C₂₋₃₁-Alkyl, eine C₃₋₃₁-Alkenyl- oder Alkapolyen-gruppe ist und R³ Citronellyl-, Farnesyl-, Geranyl-, Isophytyl- oder Phytyl-bedeutet, sowie geradkettige Carbonsäureester von DL- α -Tocopherol, insbe-sondere das Undecenoat und das Laurat.

Alle technischen Tenside wurden vor dem Eintrag in die spontan disper-gierbaren Konzentrate mittels Filtration, bzw. Chromatographie über neutra-lem Aluminiumoxyd mit einem inerten Lösungsmittel wie z.B. Tetrahydro-furan, Ethylalkohol oder Dichlormethan gereinigt.

Als Zusätze in die erfindungsgemässen spontan dispergierbaren Konzentrate eignen sich Vitamine und Provitamine (wie z.B. Vitamin A-Säure, Retinol, Tocopherole), sowie auch ausgewählte Penetrationsverbesserer ("Flux enhancers") und Radikalfänger.

VERFAHREN für Bioflavonoid-Perester mit mittel- und langkettigen Carbon-säuren

1.0 Herstellung

1.1 Nach Vorschrift A: Aufarbeitung unter Verwendung von Wasser. Einen bei 150°C getrockneten Dreihalskolben geeigneter Grösse mit Magnetrührer lässt man sich im N₂-Strom auf RT abkühlen. Dabei versieht man ihn gleichzeitig mit einem Ableitrohr und Gaszähler, einem Thermometer, sowie einem Septum. Darauf gibt man 1 g wasserfreies Flavonoid zu und löst dieses in 10 ml abs. Pyridin, wenn notwendig durch kurzes Erhitzen über dem Infrarot-brenner. Hierauf Abkühlen auf RT und Verdünnen mit je 10 ml abs. Benzol und Dichlormethan. Anschliessend weiteres Abkühlen auf 0° bis -5°C. Nun werden mit einer Spritze via Septum die zur Erzielung einer vllständig n

-- 11 --

Versetzung in zweidigen Äquivalenten Säurechlorid tragenweise und unter gutem Rühren zugegeben. Dabei bildet sich rasch ein weißer Niederschlag von Pyridinhydrochlorid. Vorteilhaft wird der Ansatz über Nacht weitergerührt, wobei man ihn auf RT kommen lässt. Die Aufarbeitung erfolgt durch Zugabe von 50 ml verdünnter Sole (z.B. 5%-iger Kochsalzlösung) und 150 ml Lösungsmittel, einschließlich der zum Transfer in einen Scheidetrichter erforderlichen Menge. Je nach Löslichkeit besteht das Lösungsmittel aus Petroleum (30-60°) oder aus seinem Gemisch mit Benzol oder aus reinem Benzol. Nach Verwerfen der Hypophase wird mit vier weiteren Portionen zu je 50 ml gewaschen. Treten beim Ausschütteln Emulsionen auf, so ist es zweckmäßig, diese durch Filtration durch eine Schicht von Celite zu brechen. Der erhaltene, meist blassgelb gefärbte Extrakt wird kurz über wasserfreiem Na_2SO_4 oder MgSO_4 getrocknet, dann filtriert und im Vakuum eingedampft. Das anfallende, ölige oder kristalline Produkt wird dann in ein geeignetes Kristallisiergefäß übergeführt und aus 2-Propanol oder aus Benzol/Acetonitril oder aus Dichlormethan/Acetonitril umkristallisiert. Erhalten werden farblose bis schwach gelb gefärbte Perester der eingesetzten Flavonoide. Sie werden bei 40-55°C und 0,01 Torr getrocknet.

1.2 Nach Vorschrift B: Aufarbeitung unter wasserfreien Bedingungen.

Die Veresterung wird nach Vorschrift A ausgeführt. Die entstandene Suspension wird jedoch direkt auf eine trocken gestopfte Säule aus 100 bis 150 ml Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm, Merck 7734), vorgewaschen mit Benzol/Aceton 99:1, gegeben und hierauf mit demselben Lösungsmittel entwickelt. Die rasch laufende, blass-zitronengelbe Hauptzone wird aufgefangen, im Vakuum eingedampft und der meist kristallin anfallende Rückstand wie unter 1.1 angegeben umkristallisiert.

1.3 Bemerkungen.

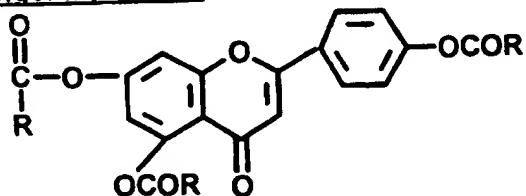
- Mit grösseren Ansätzen ist die Aufarbeitung nach Vorschrift A zweckmäßig, weil sie meist höhere Ausbeuten liefert und zudem kostengünstiger ist. Eine Aufarbeitung nach Vorschrift B vermeidet nicht nur lästige Emulsionen; sie bringt auch rascher reine Produkte und ist zeitsparend. Der Gehalt an Pyridin deaktiviert das Kieselgel und schont damit auch labile Ester an der HO-C(5).
- Die eingesetzten Flavonoide wurden bei 130°C/0,001 Torr während 20h getrocknet.
- Acylgruppen an HO-C(5) sind labil, vor allem solche mit relativ kurzen Ketten. Die Transacylierung tritt vornehmlich mit primären Alkoholen rasch

-- 12 --

ein. Mit sekundären Alkoholen ist sie stark verändert. Deshalb kann 2-Propanol zum Umkristallisieren verwendet werden. Der Nachweis eines freien H-O-C(5) lässt sich bequem mit dem NMR anhand der Bande bei ca. 12,5 ppm führen.

- Zur groben Überprüfung der Reinheit der Flavonoid-Ester eignet sich die rasche Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel mit Cyclohexan/Aceton 17,5:2,5 und Detektion im kurz- und langwelligen UV. Die Perester zeigen hohe und relativ wenig unterschiedliche Rf-Werte; jedoch können polare Verunreinigungen leicht erkannt werden.
- Quantitative UV-Spektren wurden in Dichlormethan aufgenommen, angeführt sind λ_{max} , nm- und ϵ -Werte. Die Extinktionen wurden mit dem MG der Perester berechnet.
- IR-Spektren wurden in CHCl_3 gemessen. Angegeben sind Banden im Fundamentalbereich bei cm^{-1} ; ss = sehr stark, m = mittelstark, w = schwach mit qualitativer Abschätzung ihrer Intensität, bezogen auf die stärkste Bande.
- Massenspektren meist mit ESI (Elektrospray mit $\text{CHCl}_3/\text{Methanol} + \text{NaI}$), sonst CI (chemische Ionisation mit NH_3); Auswahl von wichtigen Fragmentionen mit m/z und Intensität.
- $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden in CDCl_3 -Lösung bei 300 MHz aufgenommen, angegeben sind ausgewählte Signale und ihre δ -Werte in ppm.
- Schmelzpunkte wurden im offenen Röhrchen bestimmt und sind nicht korrigiert. In mehreren Fällen werden Intervalle beobachtet, die offensichtlich auf Phasenumwandlungen zurückzuführen sind.

2.0 Apigeninperester



1 : $\text{R} = (\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$

2 : $\text{R} = (\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$

2.1 Apigenintrilaurat (1)

$\text{C}_{61}\text{H}_{76}\text{O}_8$ (817,12); Ausbeuten: 80% nach Vorschrift A, 65% nach Vorschrift B; rahmweisse Kristalle aus Dichlormethan/Acetonitril; Smp. 103,5-105,5°C.

UV : 230 (18'300), 275 (37'500), 303 (22'700), sh. 330 (14'000).

IR : 2924 ss, 2856 s, 1398 m, 1760 s, 1657 ss, 1620 ss.

MS : 657.5 (100%) [Dilaurat + Na]⁺.

NMR : 1.05 (t, ω -CH₃); 1.44 (s, Ketten-CH₂); 1.93//2.75 (je m α -CH₂); 6.7-8.0 (Aromat npr t nen, darunter 6.85 s, H-C(3)); 12.7 (s, HO-C(5), Spur).

Verbrennungsanalyse: Ber. C 74.96 H 9.38%
Gef. C 75.00 H 9.49%

2.2 Apigenintripalmitat (2)

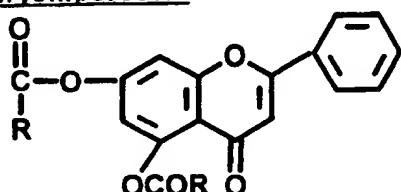
C₈₃H₁₀₀O₈ (985.43); Ausbeute 70% nach Vorschrift B; nahezu farblose Kristalle aus Dichlormethan/Acetonitril; Smp. 101-102°C.

UV : 232 (18'900), 276 (39'400), 303 (22'700), sh. 330 (14'900).

IR (CH₂Cl₂) : 2926 ss, 2853 s, 1762 m-s, 1758 s, 1620 ss, 1597 m-s.

NMR : 0.90 (t, ω -CH₃); 1.29 (s, Ketten-CH₂); 1.8//2.6 (je m α -CH₂); 6.6-7.9 (Aromatenprotonen, darunter 6.72 s, H-C(3)); 12.7 (s, HO-C(5), Spur).

3.0 Chrysinperester



3 : R = (CH₂)₁₀CH₃

4 : R = (CH₂)₁₄CH₃

3.1 Chrysindilaurat (3)

C₃₉H₅₄O₆ (618.82); Ausbeute 69% nach Vorschrift A; blassgelbe Kristalle aus Benzol/CH₃CN; Smp. 134°C.

UV : 230 (16'000), 270 (48'100), sh. 295 (24'600), 327 (15'700)

IR : 2925 ss, 2853 s, 1763 s, 1666 ss, 1619 ss, 1593 w, 1572 w (nur geringfügige Unterschiede zu Quercetinpentalaurat)

MS : 1333 (69%) [3 Monolaurat + Na]⁺; 1260 (19%) [2 Dilaurat -118 + Na]⁺; 1078 (42%) [Dilaurat + Monolaurat + Na]⁺; 896 (100%) [2 Monolaurat + Na]⁺; 641 (44%) [Dilaurat + Na]⁺; 460 (98%) [Monolaurat + Na]⁺;

NMR : 0.94 (t, ω -CH₃); 1.34 (s, Ketten-CH₂); 1.8/2.6 (je m, α -CH₃); 6.6-7.9 (Aromatenprotonen, darunter 6.78 (s, H-C(3)); 12.8 (s, HO-C(5), Spur).

Verbrennungsanalyse: Ber. C 75.69 H 8.80%
Gef. C 74.78 H 7.55%
C 74.37 H 7.32%
C 74.44 H 7.03%
C 76.29 H 7.78%

-- 14 --

Umkristallisation aus Benzol/2-Prpanol liefert das Monolaurat.

Verbrennungsanalyse: Ber. C 74.28 H 7.39%
 Gef. C 74.18 H 7.16%
 C 73.92 H 7.26%

$C_{47}H_{70}O_6$ (731.03); Ausbeute 70% nach Vorschrift A; blass-bräunlichgelbe Kristalle aus Benzol/0° oder aus Dichlormethan/Acetonitril; Smp. 104-105°C.

UV : 230 (16'800), 270 (43'500), sh. 296 (22'300), 327 (13'300)

IR : 2923 ss, 2856 s, 1765 s, 1648 ss, 1619 ss, sh. 1595 w, 1572 w (nur geringfügige Unterschiede zum Spektrum von Quercetinpentalaurat)

MS (CI mit NH_3) : 493.2 (100% [M+1-126.6])

NMR : 0.87 (t, ω - CH_3); 1.25 (s, Ketten- CH_2); 1.8/2.6 (je m, α - CH_2); 6.5-7.9 (Aromatenprotonen, darunter 6.72 (s, H-C(3)); 12.7 (s, HO-C(5), Spur).

Verbrennungsanalyse: Ber. C 77.22 H 9.65%
 Gef. C 77.36 H 9.60%

3.2 Chrysindipalmitat (4)

$C_{39}H_{54}O_6$ (618,82); Ausbeute 69% nach Vorschrift A; blassgelbe Kristalle aus Benzol/ CH_3CN ; Smp. 131.5-132.5°C.

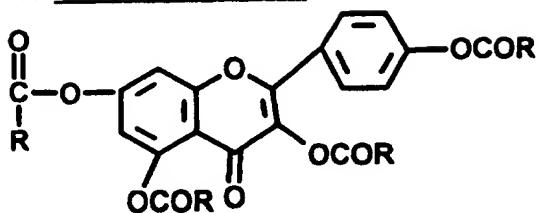
UV : 230 (16'000), 270 (48'100), sh. 295 (24'600), 327 (15'700)

IR : 2925 ss, 2853 s, 1763 s, 1656 ss, 16190 ss, 1593 w, 1572 w (nur geringfügige Unterschiede zu Quercetinpentalaurat)

MS : 1333 (69%) [3 Monolaurat + Na]⁺; 1260 (19%) [2 Dilaurat -118 + Na]⁺; 1078 (42%) [Dilaurat + Monolaurat + Na]⁺; 896 (100%) [2 Monolaurat + Na]⁺; 641 (44%) [Dilaurat + Na]⁺; 460 (98%) [Monolaurat + Na]⁺;

NMR : 0.94 (t, ω - CH_3); 1.34 (s, Ketten- CH_2); 1.8/2.6 (je m, α - CH_3); 6.6-7.9 (Aromatenprotonen, darunter 6.78 (s, H-C(3)); 12.8 (s, HO-C(5), Spur).

Verbrennungsanalyse: Ber. C 75.69 H 8.80%
 Gef. C 74.78 H 7.55%
 C 74.37 H 7.32%
 C 74.44 H 7.03%

4.0 Kämpferolperester

5 : R = $(CH_2)_{10}CH_3$

6 : R = $(CH_2)_{14}CH_3$

4.1 Kämpferoltetralaurat (5)

$C_{63}H_{98}O_{10}$ (1015,41); Ausbeuten: 90% nach Vorschrift A, 70% nach Vorschrift B; hellzitronengelbe Kristalle aus Et_2O/CH_3CN ; Smp. 85.5-98°C

UV : 230 (25'700), 268 (36'000), 307 (21'600), 338 (20'100).

IR : 2930 ss, 2850 s, 1765 s, 1665 s, 1645 s, 1617 s (Nur geringfügige Unterschiede gegenüber Quercetinpentalaurat).

MS (Cl, NH₃) : 833.2 (17%) [M+1-x]⁺; 651.2 (81%) [M+1-2x]⁺; 469.2 (100%) [M+1-3x]⁺; 287.1 [M+1-4x]⁺; x = m/z 182 (aus der α -Spaltung am Ester)

NMR : 0.81 (t, ω -CH₃); 1.19 (s, Ketten-CH₂); 1.7/2.5 (je m α -CH₂); 6.1-7.8 (Aromatenprotonen); 12.1 (s, HO-C(5), Spur).

Verbrennungsanalyse: Ber. C 74.51 H 9.73%
Gef. C 74.62 H 9.59 %

4.2 Kämpferoltetrapalmitat (6)

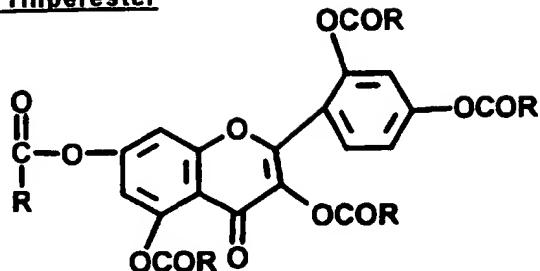
$C_{79}H_{130}O_{10}$ (1239,83); Ausbeute 75% nach Vorschrift B; hellgelbe Kristalle aus Benzol/Acetonitril; Smp. 105-110°C (aus 2-Propanol kristallisiert)

UV : 230 (25'700), 268 (35'900), 307 (21'600), 338 (20'100).

IR (CH₃Cl₂) : 2922 ss, 2850 m, 1765 m, 1654 m, 1617 s (nur geringfügige Unterschiede gegenüber Quercetinpentapalmitat).

MS : (DCI, NH₃): m/z 1239.8 (15%, M⁺: daneben Peak mit M⁺⁺¹, M⁺⁻¹, M⁺⁻², sowie m/z 1001.7 (15%), 763.5 (45%), 525.3 (100%), 287.3 (50%). Es handelt sich um die konsekutive Abspaltung von vier Pamitoylradikalen.

NMR : 0.83 (t, ω -CH₃); 1.20 (s, Ketten-CH₂); 1.7/2.5 (je m α -CH₂); 6.1-7.8 (Aromatenprotonen); 12.1 (s, HO-C(5), Spur).

3.0 Morinperester

7 : R = $(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$

8 : R = $(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$

5.1 Morinpentalaurot (7)

$\text{C}_{76}\text{H}_{120}\text{O}_{12}$ (1213,71); bräunliches, viskoses Öl, farblos nach Chromatographie an Kieselgel mit Benzol/Aceton 17:3; Ausbeute nach Vorschrift A 90%

UV : 232 (30'800), 252 (30'400), sh.ca. 295 (16'500).

IR : 2923 ss, 2853 s, 1766 s, 1712 w, 1640 m, 1622 m (nur geringfügige Unterschiede zu Quercetinpentalaurot).

MS : 1236 (81%, [Pentalaurot + Na] $^+$; 1054 (100%), [Tetralaurat + Na] $^+$.

NMR : 0.91 (t, $\omega\text{-CH}_3$); 1.28/1.30 (Ketten- CH_2); 1.64/1.78/2.6 (m $\alpha\text{-CH}_2$); 6.60-7.6 (Aromatenprotonen); 12.14 (s, HO-C(5), Spuren).

5.2 Morinpentapalmitat (8)

$\text{C}_{76}\text{H}_{160}\text{O}_{12}$ (1494,23); fast farblose Kristalle aus Benzol/2-Propanol; Ausbeute nach Vorschrift A 90%; Smp. 57-57,5°C.

UV : 232 (24'200), 248 (23'500), 286 (14'400), sh. 304 (13'300).

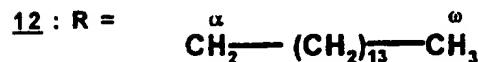
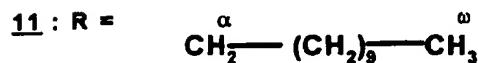
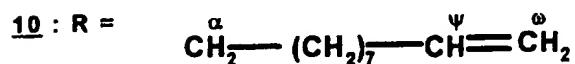
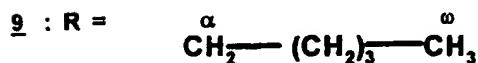
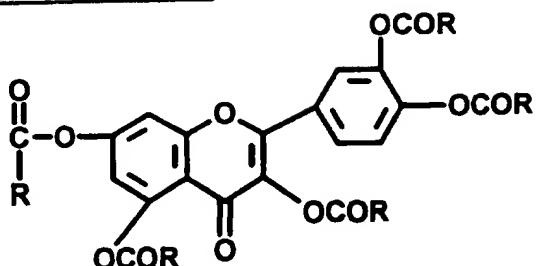
IR : 2921 ss, 2850 s, 1767 s, 1652 s, 1622 s (Nur geringe Unterschiede zum entsprechenden Quercetinderivat).

MS : 1517 (100%) [Pentapalmitat + Na] $^+$; 1279 (31%) Tetrapalmitat + Na] $^+$.

NMR : 0.91 (t, $\omega\text{-CH}_3$); 1.30 (d, Ketten- CH_2); 1.66/1.78/2.6 (je m $\alpha\text{-CH}_2$); 6.6-7.6 (Aromatenprotonen); 12.15 (s, HO-C(5), Spur).

Verbrennungsanalyse: Ber. C 76.35 H 10.79%

Gef. C 76.32 H 10.39 %

6.0 Quercetinperester**6.1 Quercetinpentacaproat (9)**

$\text{C}_{45}\text{H}_{60}\text{O}_{12}$ (792,93); Ausbeute nach Vorschrift A 60%; umkristallisiert aus 2-Propanol, rahmweisse Kristalle, Smp. 85-86°C.

UV : 231 nm (ϵ 23'900), 269 (37'600), 298 (21'000), 333 (11'600)

IR : 2962 ss, 2933 s, 2870 m, 1770 ss, 1657 s, 1616 ss.

MS : 717 (100 %), [Tetracaproat + Na]⁺

NMR : 0,89 (t, ω -CH₃); 1.352 und 1.714 (Ketten-CH₂); 2.52 (m, α -CH₂); 6.53 (d, J = 1,8, H-C(6)); 6.79 (d, J = 1,7, H-C(8)); 7.25 und 7.65 (m, H-C(2',5',6')); 12.1 (s, HO-C(5), deutlich).

Verbrennungsanalyse: Ber. C 68,16 Ber. H 7,63%

Gef. C 68,04 Gef. H 7,70%

6.2 Quercetinpentaundecenoat (10)

$\text{C}_{70}\text{H}_{100}\text{O}_{12}$ (1133,50), Ausbeute nach Vorschrift A 75%; umkristallisiert aus 2-Propanol, blassgelbe Kristalle, Smp. 63-64°C.

UV : 230 (22'500), 373 (35'690), 292 (18'800), 339 (12'200).

IR : 2930 ss, 2856 m, 1769 ss, 1650 s, 1639 s, 1620 s.

MS : 1156 (100%), [Pentaundecenoat + Na]⁺; 990 (32%) [Tetraundecenoat + Na]⁺

NMR (400 MHz) : kein ω -CH₃; 1.33/1.75/2.04/2.56/2.73 (je m, CH₂-Gruppen); 4.98 (m, 5 ω -CH₂); 5.81 (m, ψ -CH); 6.58 (d, J = 2,2, H-C(6)); 6.84 (d, J = 2,2, H-C(8)); 7.3/7.7 (je m, H-C(2',5',6')); 12.12 (HO-C(5), Spur).

Verbrennungsanalyse: Ber. C 74,17 Ber. H 8,89%

Gef. C 74,09 H 8,78%

-- 18 --

6.3 Quercetinpentalauroat (11)

$C_{76}H_{120}O_{12}$ (1213,71); Ausbeut nach Vorschrift A 75%; rahmweisse Kristalle aus 2-Propanol; Smp. 84,5-86°C.

UV : 233 (20'900), 270 (29'200), 300 (18'200).

IR : 2927 ss, 2855 s, 1770 ss, 1654 s, 1616 s.

MS : 1236 (25%), [Pentalauroat + Na]⁺; 1054 (100%) [Tetralaurat + Na]⁺

NMR : 0.93 (t, ω -CH₃); 1.318 (s. Ketten-CH₂); 2.6 (m α -CH₂); 6.62 (d, J = 2,2, H-C(6)); 6.89 (d, J = 1,4 H-C(8)); 7.3 und 7.8 (je m, H-C(2',5',6')); 12.16 (HO-C/5), deutlich).

Verbrennungsanalyse: Ber. C 74,21 Ber. H 9,97%

Gef. C 74,08 Gef. H 10,13%

6.4 Quercetinpentapalmitat (12)

$C_{95}H_{160}O_{12}$ (1494,23); Ausbeute nach Vorschrift A 80%; fast farblose Kristalle aus 2-Propanol; Smp. 90,5-91,5°C.

UV : 233 (20'800), 262 (23'800), 299 (19'900).

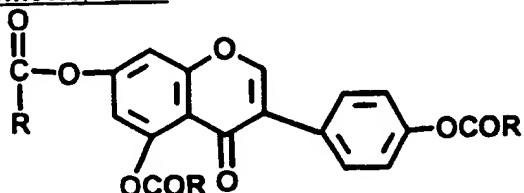
IR : 2929 ss, 2858 s, 1771 s, 1655 s, 1622 s.

MS : 1518 (100%), [Pentapalmitat + Na]⁺, 1278 (80%, [Tetrapalmitat + Na]⁺

NMR : 0.90 (t, ω -CH₃); 1.29 (s. Ketten-CH₂); 2.6 (m α -CH₂); 6.60 (d, J = 2,2, H-C(6)); 6.86 (d, J = 2,1 H-C(8)); 7.3 und 7.7 (je m, H-C(2',5',6')).

Verbrennungsanalyse: Ber. C 76,35 Ber. H 10,79%

Gef. C 76,38 Gef. H 10,86%

7.0 Genisteinester

13a : R¹ = R² = CO(CH₂)₁₀CH₃

13b : R² = H, R¹ = CO(CH₂)₁₀CH₃

14a : R¹ = R² = CO(CH₂)₁₄CH₃

14b : R² = H, R¹ = CO(CH₂)₁₄CH₃

7.1 Genisteindilaurat (13)

Zwar kann unter forcierten Acylierungsbedingungen ein Trilaurat (13a) erhalten werden, doch erweist sich dieses bei der Aufarbeitung als stabil, dass

-- 19 --

in mehr oder weniger vollständiger Übergang in das 7,4'-Dilaurat (13b) eintritt.

$C_{39}H_{64}O_7$ (634,82; Ausbeute 70% nach Vorschrift A und Umkristallisation aus 2-Propanol; farblose Kristalle; Smp. 96.5-97°C.

UV : 232 (22'100), 252.5 (32'600), 324 (4'800).

IR : 2923 ss, 2855s, 1758s, 1650ss, 1620s.

MS (ESI): (839.6 [Trilaurat+Na]⁺; 721.7 [Trilaurat-118+Na]⁺; 657.8 [Dilaurat+Na]⁺

NMR : 0.81 (t, -CH₃); 1.20 (s, Ketten-CH₂); 6.5-7.9 (Aromatenprotonen, darunter 7.89 (s, H-C(2)); 12.7 (s, HO-C(5)).

Verbrennungsanalyse: Ber. C 73.78 H 8.57%
Gef. C 73.52 H 8.21%

7.2 Genisteindipalmitat (14b)

$C_{47}H_{70}O_7$ (747,03); Ausbeute 85% nach Vorschrift B; farblose Kristalle aus 2-Propanol; Smp. 101-102°C.

UV : 230 (15'600), 256 (36'000), 326 (5'300).

IR (CH_2Cl_2): 2928ss, 2855s, 1760s, 1652s, 1622m-s, 1592m.

MS : (DCI, NH₃): m/z 746.6 (M⁺-1); 507.4 (M⁺-Palmitoyl; 85%); 269.1 (507.4-Palmitoyl; 70%).

NMR : 0.91 (t, -CH₃); 1.30 (s, Ketten-CH₂); 6.6-8.0 (Aromatenprotonen, darunter 7.99 (s, H-C(2)); 12.8 (s, HO-C(5)).

Verbrennungsanalyse: Ber. C 76.56 H 9.4%
Gef. C 75.60 H 9.16%

-- 20 --

8.0 ZUSAMMENSETZUNGSBEISPIELE von *erfindungsgemäss n, spontan dispergirbaren KONZENTRATEN*, welche die Wirkstoffe der Formeln (I) bis (IV) enthalten und welche, wenn sie mit Wasser oder 5%-Glucoselösung oder physiologischer Kochsalzlösung (Ringerlösung) verdünnt werden, thermodynamisch stabile ULTRAMIKROEMULSIONEN mit Mizellen ergeben, welche einen hydrodynamischen Radius von 2.2 bis 3.0 nm aufweisen.

a) 0,1 bis 5 Gewichts-% eines oder mehrerer Ester von ausgewählten Bioflavanoid-Verbindungen der Formeln (I) bis (IV),
 5 bis 25 Gewichts-% Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat, CHAPS, HEPES oder Neutralöl, wie z.B. Miglyol® 812 (Dynamit Nobel oder Hüls),
 0 bis 45 Gewichts-% eines Phosphorsäureester-Tensides, wie z.B. Diphosol® 3873 (CIBA-GEIGY), Tensid 508 (CIBA-GEIGY), Zerostat® AN oder AT (CIBA-GEIGY), Tinovetin® JU (CIBA-GEIGY), Soprophor® FL (RHÔNE-POULENC),
 5 bis 90 Gewichts-% Invadin JFC 800% (CIBA-GEIGY) und/oder TWEEN®-20 bis TWEEN®-85 (ICI SPECIALITIES), und wahlweise
 0 bis 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins,
 0 bis 10 Gewichts-% eines Penetrationsverbesserers, Radikalfängers oder Stabilisators.

b) 0,5 bis 5 Gewichts-% eines oder mehrerer Wirkstoffe der Formeln (I) bis (IV),

0 bis 5 Gewichts-% CHAPS oder HEPES,
 5 bis 25 Gewichts-% eines oder mehrerer biotensider Terpinylester der allgemeinen Formel (VI) :



worin R² eine C₂₋₃₁-Alkyl-, eine C₃₋₃₁-Alkenyl- oder eine C₃₋₃₁-Alkapolyen-Gruppe ist und R³ Citronellyl-, Farnesyl-, Geranyl-, Isophytyl- oder Phytyl- bedeutet,

35 bis 45 Gewichts-% Invadin® JFC 800% und/oder TWEEN®-20, -80 oder -85,

35 bis 45 Gewichts-% Soprophor® FL oder Diphosol® 3873.

N.B.: INVADIN® JFC 800% (CIBA-GEIGY) ist ein wasserfreies tert. Octyl-phenylpolyoxyethylenether-Tensid mit 9 bis 10 Oxyethylen Gruppen.

SOPROPHOR FL (RHÔNE-POULENC) ist ein praktisch wasserfreies Tristyryl-polyoxyethylen-18-phosphorsäureester TEA-Salz-Tensid.

CHAPS (Fluka 26'680; Merck-Index 11.2034) ist eine zwitteri nische Verbindung mit Formel: 3-[(3-Chlamid -pr pyl)-dim thylammoni]-propansulf nat.

-- 21 --

HEPES ist ein Good-Puffer: 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfinsäure.
 TWEEN® 20 ist ein Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monooleat-Tensid (CAS-Nr. 9005-64-5). [Polysorbate 20 in der CTFA Classification].
 TWEEN® 80 ist ein Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monooleat Tensid (CAS-Nr. 9005-65-6). [Polysorbate 80 in der CTFA Classification].
 TWEEN® 85 ist ein Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-trioleat Tensid [Polysorbate 85 in der CTFA Classification].

9.0 BEISPIEL für die pharmazeutische Herstellung eines Systempräparates mit erfindungsgemässen Konzentraten in der Form von "multiple units".

a) Granulierung

| | |
|---|---------|
| Metolose® 90 SH-4000 (Shin-Etsu Chemical) | 90.0 g |
| Avicel® PH-101 | 80.3 g |
| Erfindungsgemässes MARIGENOL®-KONZENTRAT | 139.4 g |
| Aerosil® 200 | 80.3 g |
| Σ | 390.0 g |

Granulieren/Formen im Schnellmixer oder im Rotationsbett unter Zusatz von 110 g Ethanol, brechen, sieben 18 bis 42 mesh, trocknen 24h bei 40°C.

b) MSR- und RETARD-Ausrüstung

im Rotationsbett mit AQUAT® AS-HG (Shin-Etsu Chemical) und Talk

c) Zusammensetzung fertiges Granulat/bzw. Micropellets

| | |
|--|-------|
| Kernmaterial | 44 % |
| Erfindungsgemässes MARIGENOL®-KONZENTRAT | 25 % |
| MSR-Beschichtung | 31 % |
| Σ | 100 % |

N.B.: MSR = Magensaft-Resistenz. Die Pellets/Granulate gemäss a) können auch ohne Befilmung unmittelbar in Kapseln abgefüllt werden, welche aus AQUAT® (HPMC-AS-M oder HPMC-AS-N) hergestellt sind, mit Aceton/Ethanol 1:1 verschlossen werden und so die Funktionen der MSR und der verzögerten Abgabe (Retard) angemessen steuern.

Biologische Prüfungen.

Die antitumorale Wirkung von spontan dispergierbaren Konzentraten gemäss den Zusammensetzungsexempeln a) und b) wird anhand folgender Prüfungsergebnisse bestätigt:

1.0 In vitro-Tests mit geeigneten Tumorzell-Linien

Es wurde ein biologisches Assay-System entwickelt, das mit Mikrotiterplatten und Verdünnungsreihen arbeitet. Angesetzt werden je 10^4 /ml Tumorzellen in Kulturmedium RPMI 1640 mit 10% fötalem Kalbserum inaktiviert (GIBCO); sie werden so undicht ausgesät, dass sie während des Assays in nichtkonfluenten Monolayers wachsen können. Die Probenzugabe erfolgt nach 6 bis 24 Stunden, mit 100 μ l pro Reihe, die man im 1. Loch mit 100 μ l Medium versetzt. Davon wird die Hälfte entnommen und in das folgende Loch eingebracht, wieder mit 100 μ l Medium versetzt, usf. Es entsteht eine geometrische Verdünnungsreihe n $\frac{1}{2}$.

Die Proben werden im Plaque Assay während 3 bis 5 Tagen bei 37°C mit 3½% CO₂ inkubiert. Anschliessend färben/fixieren mit 0,1% Kristallviolett (Fluka, Buchs) in einer Lösung von 70% Methanol, 1% Formaldehyd, 29% Wasser. Die Auswertung wird am Mikroskop vorgenommen, Vergrösserung 300-fach. Man bestimmt die grösste cytotoxische Verdünnung. Die quantitative Auswertung lässt sich auch mittels Scanning und Absorptionsmessung am Spektrophotometer vornehmen.

-- 23 --

2.0 Prüfung auf Zitotoxizität**2.1 Zitotoxizität der MARGENOL®-KONZENTRATE****geprüft an Py6-Zellen (Polyoma Virus transformierte 3T3 Maus-Fibroblasten)****Py6 Zytotoxizitäts-Test****24. - 28.4.1995**

| 2%-Konzentrate mit QUERCETIN-PENTA-ESTERN | 24 h Exposition Konzentrat W.S. | 48 h Exposition Konzentrat W.S. | 72 h Exposition Konzentrat W.S. |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| (C _{8:0}) ₅ - QUERCETIN | 64'000 3.2 Mio. | 128'000 6.4 Mio. | 256'000 2.8 Mio. |
| (C _{11:1}) ₅ - QUERCETIN | 128'000 6.4 Mio. | 512'000 25.6 Mio. | 512'000 25.6 Mio. |
| (C _{11:1}) ₅ - QUERCETIN Analysenrein | 256'000 12.8 Mio. | 512'000 25.6 Mio. | 1'024'000 51.2 Mio. |
| (C _{12:0}) ₅ - QUERCETIN | 128'000 6.4 Mio. | 256'000 12.8 Mio. | 1'024'000 51.2 Mio. |
| (C _{16:0}) ₅ - QUERCETIN | 256'000 | 512'000 25.6 Mio. | 1'024'000 51.2 Mio. |

**Grösste zytotoxische Verdünnung:
auf Konzentrat-, bzw. W.S.-Gehalt berechnet.**

**Zu den eternisierten Py6-Zellen vgl.: "Biochemistry", Coordinating Editor Geoffrey L. Zubay, Addison-Wesley Publishing Company, 1983, p. 1079.
Vgl. auch "Molecular Cell Biology", second Edition, by J. Darnell, H. Lodish, D. Baltimore; Scientific American Books, Chapter 5: Viruses, Structure and Functions, pp. 177-188. New York, 1990 (W.H. Freeman & Co.)**

-- 24 --

2.2 Zelltoxizität der MARGENOL®-KONZENTRATE / FORTSETZUNG
geprüft an Py6-Zellen (P₁ y₁ ma Virus transformierte 3T3 Maus-Fibroblasten)

Py6 Zytotoxizitäts-Test**Juli 1995**

| 1%-Konzentrate mit FLAVONOID- ESTERN | 24 h Exposition M.E. 1:100 W.S. | 48 h Exposition M.E. 1:100 W.S. | 72 h Exposition M.E. 1:100 W.S. |
|--|--|--|--|
| APIGENIN- TRIPALMITAT | 32'000 3.2 Mio. | 128'000 12.8 Mio. | -- |
| CHRYSIN- DILAURAT | 128'000 12.8 Mio. | 512'000 51.2 Mio. | 1 Mio. 100 Mio. |
| CHRYSIN- DIPALMITAT | 128'000 12.8 Mio. | 512'000 51.2 Mio. | 512'000 51.2 Mio. |
| GENISTEIN- DIPALMITAT | 32'000 3.2 Mio. | 256'000 25.6 Mio. | -- |
| KÄMPFEROL- TETRAPALMITAT | 32'000 3.2 Mio. | 128'000 12.8 Mio. | -- |
| MORIN- PENTALAURAT | 128'000 12.8 Mio. | 1 Mio. 100 Mio. | 1 Mio. 100 Mio. |
| MORIN- PENTAPALMITAT | 64'000 6.4 Mio. | 512'000 51.2 Mio. | 512'000 51.2 Mio. |

Grösste zytotoxische Verdünnung:
auf Mikroemulsion, bzw. W.S.-Gehalt berechnet.

-- 25 --

2.3 *In-vitro -Prüfung an humanen Tumorzell-Linien (Dosis-Abhängigkeit)*

VITALITÄTSTEST

QUERCETIN-PENTA-10-UNDECENOAT

 1×10^4 Zellen pro LochProliferationstest (Tritium: 1 μ Ci/well H⁺)

| ZELL-LINIE VERDÜNNUNGEN | LC 89 | | U 937 | |
|----------------------------|--------|-----|---------|------|
| | cpm | % | cpm | % |
| 10-2 = 1 : 100 | 470 | 16 | 788 | 0.4 |
| 10-3 = 1 : 1'000 | 628 | 21 | 838 | 0.4 |
| 10-4 = 1 : 10'000 | 10'064 | 347 | 79'515 | 40.7 |
| 10-5 = 1 : 100'000 | 3'506 | 120 | 204'835 | 104 |
| 10-6 = 1 : 1'000'000 | 3'465 | 119 | 197'321 | 101 |
| 10-7 = 1 : 1'000'000 | 4'098 | 141 | 199'231 | 102 |

Kontrollen: 2'906 cpm 195'125 cpm

LC 89 : Lungen-Adenokarzinom

U 937 : Akute mieloide Leukämie

Arbeiten durchgeführt von Dottoressa Anna Rita GUARINI, Università degli Studi di Torino, Clinica medica, 13. bis 16.6.1995 .

AUSWEIS: %-Vitalität nach 48 Stunden mit 2%-MARGENOL®-KONZENTRATEN, als wässrige Ultramikroemulsion dem Medium einmalig beigegeben. Bei der Beurteilung beachte man die verhältnismässig kurze Expositionszeit von 48 h. Verdünnung 1:10² = 10'000 ppm Konzentrat, 200 ppm Wirksubstanz; etc.

-- 26 --

**2.4 In-vitro-Prüfung an hum. hum. Tumorzell-Linien
(Dosis-Wirkungs-Beziehung)**

VITALITÄTSTEST / 1%-MARGENOL-KONZENTRATE

Erythrozyten-LEUKÄMIE K 562

1 x 10⁴ Zellen pro Loch

Proliferationstest (Tritium: 1 µCi/well H⁺)

| PRÄPARAT | 10⁻³ | | 10⁻⁴ | | 10⁻⁵ | | |
|------------------------------|------------------------|------------|------------------------|--------------|------------------------|---------------|-------------|
| | VERDÜNNUNG | cpm | % | cpm | % | cpm | % |
| MORIN-PENTALAURAT | | 448 | 0.8 | 1'083 | 2.1 | 14'818 | 29.6 |
| MORIN-PENTAPALMITAT | | 544 | 1.0 | 899 | 1.7 | 23'666 | 47.2 |
| CHRYSSIN-DILAURAT | | 498 | 0.9 | 601 | 1.2 | 16'532 | 33.0 |
| CHRYSSIN-DIPALMITAT | | 484 | 0.9 | 492 | 0.9 | 3'928 | 7.8 |
| QUERCETIN-PENTALAURAT | | 392 | 0.7 | 536 | 1.0 | 2'745 | 5.4 |

Arbeiten durchgeführt von Dottoressa Anna Rita Guarini, Università degli Studi di Torino, Clinica medica, 21. bis 24.8.1995. Kontrollen 50'037 cpm.

Testanlage wie bei 2.3

AUSWEIS: %-Vitalität nach 48 Stunden mit 1% MARGENOL®-KONZENTRATEN, als wässrige Ultramikroemulsion dem Medium einmalig beigegeben. Bei der Beurteilung beachte man die verhältnismässig kurze Expositionszeit von 48 h. Verdünnung 10⁻³ = 1'000 ppm Konzentrat, 10 ppm Wirksubstanz; etc.

-- 27 --

2.4 In-vitro -Prüfung an humanen Tumorzell-Linien**(Dosis-Wirkungs-Beziehung)****VITALITÄTSTEST / 1%-MARGENOL-KONZENTRATE
LEUKÄMIE DAUDI-LINIE** **1×10^4 Zellen pro Loch****Proliferationstest (Tritium: 1 μ Ci/well H⁺)**

| PRÄPARAT VERDÜNNUNG | 10^{-3} | | 10^{-4} | | 10^{-5} | |
|------------------------------|------------|------------|------------|------------|---------------|-------------|
| | cpm | % | cpm | % | cpm | % |
| MORIN-PENTALAURAT | 393 | 1.7 | 463 | 2.0 | 12'508 | 54.1 |
| MORIN-PENTAPALMITAT | 374 | 1.6 | 632 | 2.7 | 15'234 | 65.9 |
| CHRYGIN-DILAURAT | 271 | 1.1 | 574 | 2.4 | 10'286 | 44.5 |
| CHRYGIN-DIPALMITAT | 401 | 1.7 | 624 | 2.7 | 9'173 | 39.7 |
| QUERCETIN-PENTALAURAT | 353 | 1.5 | 384 | 1.6 | 9'541 | 41.3 |

Arbeiten durchgeführt von Dottoressa Anna Rita GUARINI, Università degli Studi di Torino, Clinica medica, 21. bis 24.8.1995. Kontrollen 23'090 cpm.

Testanlage wie bei 2.3

3.0 Prüfung auf MT4-Zellen, infiziert mit dem AIDS-VIRUS

Tests durchgeführt von Prof.Dott. Alberto BIGLINO, Direttore dell'Ospedale Generale di Asti, am Istituto delle Malattie Infettive, Università degli Studi di Torino (Direttore: Prof.Dr. P. Gioannini), Assistenz: Dott.ssa Brunella FORNO und Dott.ssa Annamaria POLLONO. März bis April 1995.

3.1 Schutzeffekt auf die Wirtzellen (MT4-Lymphozyten)

Der HIV III B-Komplex wurde während 4 Tagen in einer Konzentration von 10 CCID₅₀/Kultur und well ("CCID₅₀/ml = 50% cell culture infective dose") angewandt. Die beste Schutzwirkung wurde bei einer Konzentration des geprüften MARGENOL®-Konzentrates von 10^{-4} erzielt (= 100 ppm Konzentrat in wässriger Mikroemulsion) von Quercetin-penta-10-undecenoat.

-- 28 --

3.2 Direkte antivirale Wirkung, bzw. therapeutischer Effekt gegen die s. g. erworbene Immunschwäche, das humane "Acquired Immuno-Deficiency Syndrome: AIDS", bzw. gegen pathologisch wirksame Prionen.

Anwendung des HIV III B-Komplexes bei einer mittleren Konzentration von 300 CCID₅₀/ml. Inkubation während 3h bei 4°C, in Gegenwart der antiviral, bzw. viruzid wirksamen Mikroemulsion. Dann Übertragung auf die MT4-Zellen. Gegenüber den nicht infizierten Kontrollen kann eine klare, Dosis-abhängige Hemmwirkung nachgewiesen werden.

Für die angewandte Prüfmethode vgl. u.a.: Rudi Pauwels, Erik De Clercq et al.: *Sensitive and rapid assay on MT4 cells for detection of antiviral compounds against the AIDS virus*. Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, 3000 Leuven, Belgium, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), 1987 (0166-0934/87/503.50); *J.Virol. Methods* 1987; **16**, 171-85.

Cf. auch: A. Bergamini, C.F. Perna, et al.: *A tetrazolium-based colorimetric assay for quantification of HIV-induced cytopathogenicity in monocyte-macrophages exposed to macrophage colony-stimulating factor*. *J.Virol. Methods*, 1992; **40**(3), 275-86.

Jay A. Levy: "HIV research: a need to focus on the right target", *The Lancet*, Vol. 345, June 24, 1995, pp. 1619-21.

Molecular Cell Biology, second Edition, by J. Darnell, H. Lodish, D. Baltimore; *Scientific American Books*, Chapter 5: *Viruses, Structure and Functions*, pp. 177-1888. New York, 1990 (W.H. Freeman & Co.)

4.0 Andere Viren

4.1 Cytomegalie-Virus (CMV)

Die Prüfung wurde mit humanen, embryonalen Lungenfibroblasten als Wirtszellen vorgenommen, die dann mit dem CMV-Stamm AD 169 infiziert wurden.

Der Stamm "CVM umano AD169" wurde während 4h bei +4°C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfsubstanz C_{18:0}-β-Sitosterylester, formuliert als 1%-iges Konzentrat und dann verdünnt zu einer wässrigen Mikroemulsion 10⁻³, 10⁻⁴ und 10⁻⁵, inkubiert und daraufhin als vorbehandelte Virus-Suspensionen auf Kulturen von menschlichen, embryonalen Lungenfibroblasten überimpft. Ansatz als konfluente Kultur mit 120'000 Zellen pro shell-vial. Die Infektion wurde mittels Zentrifugation während 45 Minuten bei 1500 rpm und bei RT von 22°C durchgeführt, wobei die Injektionssuspension entfernt und 1 ml Kulturmedium MEM mit 2% fötalem Kalbserum (wie bei der Anzucht) beigegeben.

-- 29 --

geben wurde; die infizierten Zellen wurden s dann während 20h bei 37°C und unter 5%-iger CO₂-Atm sphäre gehalten.

Am Schluss der Inkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen gesammelt, mit 2% Aceton-Methanol (2:1) fixiert und 3 Mal mit PBS gewaschen.

Die Quantifizierung erfolgte mittels Immunofluoreszenz-Messung. Die Vials wurden mit dem monoklonalen Antikörper "Anti-P-72 CMV" (einem unmittelbaren Vorläuferprotein des CMV, das schon nach 6 h in den infizierten Zellen nachgewiesen werden kann) versetzt und während 30 Minuten bei 37°C in feuchter Atmosphäre inkubiert.

Es folgten 3 Waschungen in PBS, eine zweite Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Antikörper IgG Ziege anti-IgG Maus. Es schliesst sich eine nochmalige Inkubation während 30 Minuten bei 37°C, wie oben angegeben, an, gefolgt von einer 3-maligen Waschung mit PBS. Die Proben werden dann mit 50% Glycerol in PBS auf Glasträger montiert.

Gleichzeitig wurden Kontrollen aufbereitet mit infizierten Zellen, die unter gleichen Bedingungen, aber ohne Vorbehandlung mit der Prüfsubstanz aufbereitet worden sind.

Gezählt werden die für das CMV-spezifische Antigen positiven Nuclei, mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskopes bei 25-facher Vergrösserung in wässriger Phase.

Es lässt sich ganz eindeutig eine Dosis-abhängige, direkt viruzide Wirkung feststellen. Das Virus ist nicht mehr virulent genug, um die empfindlichen Wirtzellen zu infizieren.

ERGEBNIS:

VIRUZIDE WIRKUNG
des β -SITOSTERYL-PALMITATES
(als MARIGENOL®-KONZENTRAT formuliert)

| KONTROLLEN: Anzahl der Anti- gene (anti P-72) | KONZENTRATION MIKROEMULSION 1:1'000 | KONZENTRATION MIKROEMULSION 1:10'000 | KONZENTRATION MIKROEMULSION 1:100'000 |
|---|---|--|---|
| 115'000 | 0 | 2 | 82'000 |

Anzahl der "Nuclei positivi" per P-2

Prüfungen durchgeführt von Dottoressa Rossana CAVALLO, Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Torino, Juli-November 1995.

-- 30 --

4.2 Herpes-Virus (Herp s simplex, HSV)

Die antivirale Wirkung einer wässrigen Mikroemulsion von geigneten MARIGENOL®-Konzentraten wird mithilfe einer konfluenten Kultur von VERO-Zellen (d.h. "African green monkey kidney cells") festgestellt. Die Wirtzellen werden während 3h bei 4°C mit der Mikroemulsion vorbehandelt und dann mit einer konstanten Dosis von 10^4 Herpes simplex Viren, sog. "plaque forming units" = PFU infiziert. Dauer der Virus-Absorption 1 h. Dann Zugabe von 2% Methylcellulose zur Verhinderung der Spreitung des Virus; es entsteht ein elastisches Vlies im Kulturmedium MEM + 2% fötalem Kalbserum. Anzüchtung während 48 h, dann Fixieren und Färben der Monolayers mit 1% Kristallviolett in Methanol.

Die antivirale Wirkung korreliert mit der Zahl von "plaques" von mit einer Prüfsubstanz behandelten, lysierten Zellen, die sich im Kulturmedium MEM + 2% FCS noch bilden. Die Herabsetzung des viralen Titers wird im %-Verhältnis zu den Kontrollen (21 Plaques pro Zelle) angegeben.

Als Prüfsubstanzen wurden folgende Konzentrate in wässriger Verdünnung (ausgehend von einer Mikroemulsion 1:100) eingesetzt:

1 % $C_{20:0}$ - β -SITOSTERYL-ESTER
 1 % QUERCETIN-PENTA-10-UNDECENOAT
 1 % $C_{16:0}$ - β -SITOSTERYL-ESTER
 1 % $C_{12:0}$ -ERGOSTERYL-ESTER

Auswertung:

| VERDÜNNUNG | $C_{20:0}$ - β -SITO-ESTER: (ARACHIDAT) | QUERCETIN-PENTA-10-UNDECENOAT | $C_{16:0}$ - β -SITO-ESTER (PALMITAT) | $C_{12:0}$ -ERGO-ESTER: (LAURAT) |
|-------------|--|-------------------------------|--|-------------------------------------|
| 1 : 10'000 | 76 % | 48 % | 24 % | 62 % |
| 1 : 100'000 | 5 % | 0 % | 0 % | 0 % |

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche direkte Wirkung auf die HS-Virus-infizierten VERO-Wirtzellen. Bei einer Konzentration von 10^4 β -Sitosterylarachidat erscheint die Zahl der Plaques, im Vergleich mit den Kontrollen, um 76% herabgesetzt; für das Quercetinpenta-10-undecenoat liegt dieser Wert bei 48%. Der HSV-Titer ist deutlich vermindert.

Bei dieser Konzentration der geprüften Substanzen findet auch keine Lysierung, weder von eternalisierten Lymphozyten vom Typus MT4, noch der VERO-Zellen selber statt. (MT4-Lymphozyten sind eine humane, Leukämie-transformiert T-Zell-Linie).

Wiederholung der Prüfung mit Fluoreszenz-Markierung wie beim CMV-Versuch. Vgl. oben 4.1

VIRUZIDE WIRKUNG
des β -SITOSTERYL-ARACHIDATES
(als MARIGENOL®-KONZENTRAT formuliert)

| KONTROLLEN: Anzahl der infizierten Zellen | KONZENTRATION MIKROEMULSION 1:1'000 | KONZENTRATION MIKROEMULSION 1:10'000 | KONZENTRATION MIKROEMULSION 1:100'000 |
|---|---|--|---|
| 38 | 0 | 0 | 20 |

Prüfungen durchgeführt von Dottoressa Rossana CAVALLO, Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Torino. Juli und November/Dezember 1995.

4.3 Hepatitis-B Virus (HBV)

Die Tests wurden mit immortalisierten Leberhämatom-Zellen vorgenommen, die nach Infektion mit dem Hepatitis-B Virus die beiden Antigene Hbs Ag (ein "surface antigen" aus der äusseren Hülle des Virus) und Hbe Ag (ein "core antigen" aus dem Kern des DNA Virus) sezernieren. Orientierende Versuche in-vitro wurden mit je einem 1%-igen Konzentrat der drei Prüfsubstanzen β -Sitosteryl-Palmitat, β -Sitosteryl-Arachidat und Ergosteryl-Isovalerat von Prof. Dott. Antonio Ponzetto und von Dott^a Rossana Cavallo, Università di Torino, durchgeführt.

Bei einer Verdünnung von 10^{-6} und Inkubation über 72h zeigte bislang das β -Sitosteryl-Palmitat Konzentrat die stärkste Wirksamkeit. Die Ergebnisse sind deutlich Dosis-abhängig und variieren auch mit der Inkubationszeit. Besonders ausgeprägt tritt die Wirkung beim Oberflächen-Antigen Hbs Ag in Erscheinung.

-- 32 --

HEPATITIS-B
Sezernierte Antigene

| PRÄPARAT | Hbs Ag | Hbe Ag |
|---------------------------------|-------------------|--------------------|
| KONTROLLEN in Medium 1:4 | 17.97 pos. | 18.707 pos. |
| Titerbestimmung | | |
| β-SITOSTERYL-PALMITAT | 1.47 neg. | 1.777 neg. |
| β-SITOSTERYL-ARACHIDAT | 3.76 pos. | 3.935 pos. |
| ERGOSTERYL-ISOVALERAT | 5.78 pos. | 6.27 pos. |

5.0 Analytischer Nachweis**5.1 Identifikation von Flavonoid-Ester-Wirksubstanz**

Kapillarzonen-Elektrophorese mit einem Gerät P/ACE 2100 von Beckman Instruments, bzw. einem BioFocus Integrator von BIO-RAD Laboratories.

Bedingungen: Puffer pH = 9.0 Na-tetra-Borat; 50 mM SDS

Injection: 20 psi*sec. Run 15 kV, Messung bei 192 nm

Der Wirksubstanz-Peak erscheint nach ca. 5 Minuten.

Sehr hohe Auflösung

5.2 Identifikation der Konzentrat-Mizellen in der wässrigen Mikroemulsion/bzw. im gereinigten und hochzentrifugierten Überstand des Zellplasmas der Tumorzellen.

Gleiche Methodik wie 5.1.

Der charakteristische Peak erscheint nach ca. 5 Minuten.

5.3 Nachweis der Membran-Penetration an der Tumorzelle

Am Lichtmikroskop (wie auch am Elektronenmikroskop) lässt sich aufzeigen, dass wenige Stunden nach der Inkubation (Beispiel Py6-Zellen = Polyoma-Virus transformierte 3T3-Mausfibroblasten; dünn ausgesät, mittlere Verdünnung der Wirkstoff-Konzentrate) sich ein Kranz von Vakuolen um den Zellkern herum ausbildet. Als Markiersubstanz kann dem Konzentrat eine kleine Menge Canthaxanthin beigegeben werden, das eine deutliche Fluoreszenz besitzt. Es eignen sich auch Phenosafranin, Tinopal® GS oder Uvitex® CF, bzw. EBF. Der analytische Nachweis, dass diese Vakuolen die Flavonoidester als Wirksubstanz enthalten, erfolgt ebenfalls mittels mizellärer Kapillar-Zonen-Elektrophorese "MECC", (Beckman Instruments, P/ACE System 2100 oder dem BioFocus Integrator von Bio-Rad).

-- 33 --

Vgl. im übrigen: K. ji Otsuka et al.: "Separation of lipophilic compounds by micellar electrokinetic chromatography with organic modifiers", Electrophoresis, 1994, 15, 1280-83 (VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim).

6.0 Allgemeine Verträglichkeit der MARIGENOL®-Präparate

AUSWIRKUNG auf das BLUTBILD
TOXIZITÄT von MARIGENOL®-KONZENTRATEN
 an der BALB/c-Maus
 %-Anteil der Blutkörperchen

| Präparat | L | M | N | E | B |
|------------------------------|---------|--------|--------|--------|-------|
| G 17 10-7 10-5 10-3 | 70 ± 6 | 11 ± 3 | 13 ± 4 | 6 ± 4 | 0 |
| | 77 ± 6 | 6 ± 3 | 11 ± 4 | 5 ± 4 | 1 ± 1 |
| | 69 ± 10 | 7 ± 5 | 22 ± 8 | 2 ± 2 | 0 |
| G 41 10-7 10-5 10-3 | 77 ± 6 | 6 ± 3 | 13 ± 5 | 3 ± 3 | 0 |
| | 78 ± 4 | 10 ± 2 | 10 ± 4 | 1 ± 1 | 1 ± 1 |
| | 80 ± 6 | 8 ± 2 | 10 ± 6 | 12 ± 1 | 0 |
| G 44 10-7 10-5 10-3 | 74 ± 17 | 10 ± 1 | 20 ± 9 | 1 ± 1 | 0 |
| | 74 ± 6 | 9 ± 4 | 14 ± 7 | 4 ± 3 | 0 |
| | 76 ± 5 | 6 ± 4 | 16 ± 8 | 2 ± 1 | 0 |
| G 55 10-7 10-5 10-3 | 78 ± 4 | 10 ± 4 | 10 ± 4 | 2 ± 1 | 0 |
| | 69 ± 10 | 11 ± 3 | 18 ± 4 | 1 ± 1 | 0 |
| | 77 ± 5 | 6 ± 4 | 14 ± 2 | 2 ± 1 | 1 ± 1 |
| KONTROLLEN (Phys. Puffer) | 76 ± 5 | 8 ± 2 | 15 ± 4 | 1 ± 1 | 0 |

-- 34 --

**G 17 2%-Konzentrat mit C_{6:0}-CHOLESTERYL-ESTER
(Cholesteryl-iso-Valerat)**

**G 41 2%-Konzentrat mit C_{11:1}-ERGOSTERYL-ESTER
(Ergosteryl-10-Undecenoat)**

**G 44 2%-Konzentrat mit C_{18:2}-CHOLECALCIFERYL-ESTER
(C_{18:2}-D₃ ; Vitamin-D₃-Linolat)**

**G 55 2%-Konzentrat mit C_{4:1}-CHOLECALCIFERYL-ESTER
(C_{4:1}-D₃ ; Vitamin-D₃-Crotonat)**

Verdünnungen: 10⁻⁷ = 0,1 ppm Konzentrat; 0,002 ppm Wirksubstanz
10⁻⁵ = 10 ppm Konzentrat; 0,200 ppm Wirksubstanz
10⁻³ = 1'000 ppm Konzentrat; 20,000 ppm Wirksubstanz
(auf die wässrige Mikroemulsion berechnet)

Legende:

L = Lymphocyten

M = Monocyten (Makrophagen)

N = Neutrophile Granulocyten

E = Eosinophile Granulocyten

B = Basophile Granulocyten

Durchführung der Proben: Prof. Dott. Guido FORNI, Dott^a Stefania VAI,
Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche,
Ospedale San Luigi Gonzaga, I-10043 ORBASSANO (TO), August/
September 1993.

Test mit normalen 8-wöchigen weiblichen BALB/c nAncr (H-2d)-Mäusen, geliefert von Charles River Laboratories, Calco (Italien). Während 4 Wochen täglich zweimalige Injektion i.v. von je 0,250 ml wässriger Mikroemulsion, gebildet aus den angegebenen Konzentraten, bzw. mit physiologischem Puffer für die Kontrollen. Färbung mit May Grünwald-Giemsa.

Zeit der Behandlung: 28 Tg.

Blutanalyse: nach der letzten Injektion

Anzahl Tiere: 13 Gruppen zu 5 je Tieren

RESULTAT: Es treten keine signifikanten Unterschiede auf zu den Kontrollen. Es konnte keine Toxizität der Konzentrate auf die Leukozyten-Population festgestellt werden. Auch die Erythrozyten-Population zeigte normale Werte. Alle Tiere waren und blieben gesund bis zum Schluss der Versuche.

6.1 UNTERSUCHUNG des BLUTBILDES

***Auswirkung der MARIENOL®-KONZENTRATE
auf normale humane Lymphomonocyten***

Zellen: normale humane phagozytische weisse Blutzellen
(Macrophagen); 2×10^5 Zellen pro well

Stimulation der Kontrollen: 1 % PHA (Phytohemagglutinin)

| PRÄPARAT | VERDÜNNUNG | TEST 1 | TEST 2 | TEST 3 |
|---|--|--|--|--|
| KONTROLLEN PHA 1% | | cpm 2682 80'981 | cpm 3386 61'966 | cpm 3386 61'966 |
| KONZEN- TRATE als wässrige MIKROEMUL- SIONEN | 10-1 10-2 10-3 10-4 10-5 10-6 | 1076 1396 1431 1386 1656 2536 | 3826 3726 2141 3221 2888 2105 | 3936 3845 2939 2752 3093 3046 |

Test 1 : 2%-Konzentrat enthaltend C_{12:0}-Cholesteryl Ester

Test 2 : 2%-Konzentrat enthaltend C_{18:0}-Ergosteryl Ester

Test 3 : 2%-Konzentrat enthaltend C_{6:0}-Cholecalciferyl Ester
(Vitamin D₃-iso-Valerat)

Tests durchgeführt von Dottoressa Anna Rita GUARINI, Università degli Studi
di Torino, Clinica medica, I-10126 TORINO, 21. bis 24. März 1994.

7.0 Antiparasitäre Wirkung

**Schweizerisches Tropeninstitut, Basel
In-vitro Versuche, WHO-screening as SOP**

| Parasite | Strain | Stage | Standard | Test N° |
|-----------------|--------------------|-----------------|-------------|----------|
| T.b.rhodesiense | STIB 900 | trypomastigotes | Melarsoprol | T9611 |
| L.donovani | MHOM-ET- 67/L82 | amastigotes | Pentostam | L9604/05 |
| T.cruzi | MHOM/Br/00/Y | trypomastigotes | Benznidazol | C0606/08 |

Alle Werte: $\mu\text{g}/\text{ml}$

-- 36 --

Legende* r = active in *T.b.rhodesiense*
 d = active on *L. donovani* t = cytotoxic in mammalian cells
 c = active on *T. cruzi* - = inactive or low activity

MIC = minimum inhibitory concentration

IC₅₀ = 50% killing rate concentration

| TDR-Code | <i>T.b. rhodesiense</i> | | <i>T. cruzi</i> | <i>L. donovani</i> | Cytotoxicity | | Test score * r,d,c, t,- |
|-----------|-------------------------|------------------|-----------------|--------------------|--------------|------------------|-------------------------------|
| | MIC | IC ₅₀ | | | MIC | IC ₅₀ | |
| Standards | 0.011 | 0.0004 | 3.7 | 30 | >100 | >90 | |
| EP1 | 100 | - | 100 | 20 | >100 | 90 | d |
| EP2 | 100 | - | 100 | 20 | >100 | 90 | d |
| EP4 | 100 | - | 100 | 20 | >100 | 90 | d |
| EP5 | 100 | - | 100 | <30 | 100 | 90 | d |
| EP10 | 100 | - | 100 | <30 | 100 | 90 | d |
| EP17 | 100 | - | 100 | 20 | >100 | 90 | d |
| EP19 | 100 | - | 100 | 20 | >100 | 90 | d |
| 4 N | 33 | 17 | 100 | 20 | >100 | >90 | d |
| 7N | 11 | 6,9 | 33 | 8 | 100 | 90 | d |
| T1 | >100 | 18,0 | 100 | <30 | 100 | 90 | d |
| T5 | 100 | 17 | 100 | 6 | 100 | 90 | d |
| T6 | 100 | 17 | 100 | <30 | 100 | 90 | d |
| T7 | 100 | 16 | 100 | <30 | 100 | 90 | d |
| T9 | 100 | 16 | 100 | <30 | 100 | 90 | d |
| T10 | 100 | 16 | 100 | <30 | 100 | 90 | d |
| T11 | 100 | 18 | 100 | <30 | 100 | 90 | d |
| T12 | 100 | 20 | | <30 | | 90 | d |

| | | |
|-------|---------------|---|
| EP 1 | 1%-Konzentrat | CHOLESTANYL-ISOVALERAT |
| EP 2 | 1%-Konzentrat | CHOLESTANYL-10-UNDECENOAT |
| EP 4 | 1%-Konzentrat | CHOLESTERYL-n-VALERAT |
| EP 5 | 1%-Konzentrat | CHOLESTERYL-LAURAT |
| EP 10 | 1%-Konzentrat | β -SITOSTERYL-BEHENAT |
| EP 17 | 1%-Konzentrat | VITAMIN D ₃ -UNDECENOAT |
| EP 19 | 1%-Konzentrat | VITAMIN D ₃ -OLEAT |
| 4N | 1%-Konzentrat | QUERCETIN-OCTALAUROYL-GLUCOSID |
| 7N | 1%-Konzentrat | Z-Gly-Phe-VITAMIN D ₃ -ESTER |
| T1 | 1%-Konzentrat | COEMULGATOR + TENSIDE |
| T5 | 1%-Konzentrat | 14-OH-10-DEACETYLBACCATIN-III |

-- 37 --

| | | |
|-----|---------------|-------------------------------|
| T6 | 1%-Konzentrat | 3,28-LAUROYL-BACCATIN-III |
| T7 | 1%-Konzentrat | QUERCETIN-PENTALAURAT |
| T9 | 1%-Konzentrat | DECALAUROYL-RUTINOSID |
| T10 | 1%-Konzentrat | β -SITOSTERYL-PALMITAT |
| T11 | 1%-Konzentrat | β -SITOSTERYL-ARACHIDAT |
| T12 | 1%-Konzentrat | ERGOSTERYL-LAURAT |

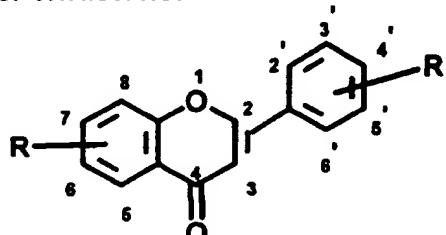
Die Versuche wurden unter der Leitung von Prof.Dr. Ronald Kaminsky von Frau Yvonne Grether durchgeführt.

Ergebnis: eine beachtliche antiparasitäre Wirkung zeigte sich mit ausgewählten Cholestanyl- und Bioflavonoidester-Konzentraten, wie auch mit dem Z-Gly-Phe-D₃-ester Konzentrat. Die Tests wurden bei einer Konzentration durchgeführt, welche keine basale Zytotoxizität bei murinen Muskelzellen oder bei Macrophagen hervorruft. Die Wirkung ist spezifisch gegen Leishmania donovani.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

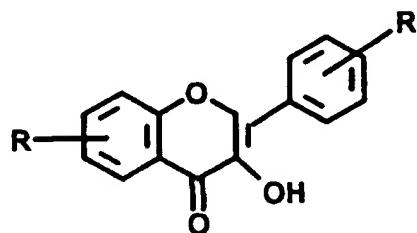
1. Spontan dispergierbares Konzentrat, welches mit Wasser, mit 5%-iger Glucosolösung oder mit Ringerlösung verdünnt, thermodynamisch stabile Ultramikroemulsionen ergibt, die Mizellen mit einem hydrodynamischen Radius von 2.2 bis 3.0 nm aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass es pharmazeutisch verwendbar ist und aus folgenden Bestandteile besteht:

0,1 bis 5 Gewichts-% einzelner oder mehrerer Ester von ausgewählten Bioflavonoid-Verbindungen laut den Formeln (I) bis (IV), bzw. einer Kombination solcher Wirkstoffe:



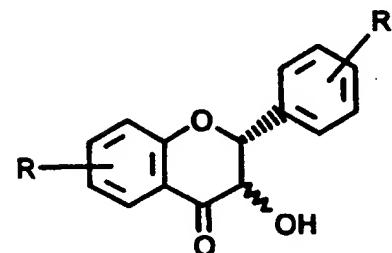
(I)

R = OH, OCH₃,



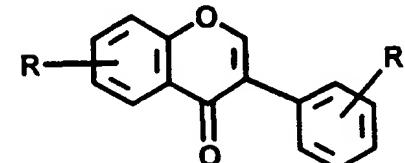
(II)

R = OH, OCH₃,



(III)

R = OH, OCH₃,



(IV)

R = OH, OCH₃,

-- 39 --

w bei in den Formeln (I) bis (IV) R für Hydroxyl, eine C₆₋₃₁-Alkyl-, eine C₉₋₃₁-Alkenyl- oder eine C₉₋₃₁-Alkap lyengrupp steht,
 5 bis 25 Gewichts-% eines als C emulgator di nenden, pharmaverträglich n Lösungsvermittlers oder Lösungsmittelgemisches,
 5 bis 90 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Tensides oder Tensidgemisches, und wahlweise
 0 bis 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins,
 0 bis 10 Gewichts-% eines Stabilisators, Radikalfängers oder Penetrationsverbesserers.

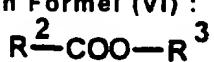
2. Pharmazeutisch verwendbares Kombinationspräparat, das aus 90 Gewichts-% des spontan dispergierbaren Konzentrates gemäss Anspruch 1 und 10 Gewichts-% pharmaverträglichen Zuschlag- oder Trägerstoffen und/oder Lösungsvermitteln besteht.

3. Spontan dispergierbares Konzentrat, enthaltend eine oder mehrere Verbindungen der Formeln (I) bis (IV) gemäss Anspruch 1, als Mittel zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates hoher Bioverfügbarkeit und mit Wirksamkeit gegen Tumore, Ekzeme und Psoriasis, sowie zur verstärkten Aufnahme von exogenen Aktivatoren, metabolischen Modulatoren und Regulatoren.

4. Spontan dispergierbares Konzentrat, enthaltend eine oder mehrere Verbindungen der Formeln (I) bis (IV) gemäss Anspruch 1, als Mittel zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates mit antiviraler, viruzider oder antiparasitärer Wirksamkeit.

5. Spontan dispergierbares Konzentrat gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Bestandteile enthält:

0,5 bis 5 Gewichts-% eines oder mehrerer Ester von Bioflavonoid-Verbindungen der Formeln (I) bis (IV),
 0 bis 5 Gewichts-% eines Good-Puffers,
 5 bis 25 Gewichts-% Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat, Neutralöl (Oleum neutrale), und/oder eines oder mehrerer biotensider Terpinylester der allgemeinen Formel (VI) :



(VI)

-- 40 --

worin R₂ eine C₆₋₃₁-Alkyl-, eine C₉₋₃₁-Alkenyl- oder eine C₉₋₃₁-Alkapolyen-Gruppe ist und R₃ Citronellyl-, Farnesyl-, Geranyl-, Isophytyl- oder Phytyl-bedeutet,
 0 bis 45 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Phosphorsäureester-Tensides,
 5 bis 90 Gewichts-% des wasserfreien tert. Octylphenylpolyoxyethylenether-Tensids mit 9 bis 10 Oxyethylen Gruppen und/oder Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat.

6. Spontan dispergierbares Konzentrat gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Bestandteile umfasst:

0,5 bis 5 Gewichts-% eines oder mehrerer Ester von Bioflavonoid-Verbindungen der Formeln (I) bis (IV),

5 bis 25 Gewichts-% eines oder mehrerer biotensider Terpinylester der allgemeinen Formel (VI):



worin R₂ eine C₆₋₃₁-Alkyl-, eine C₉₋₃₁-Alkenyl- oder eine C₉₋₃₁-Alkapolyen-Gruppe ist und R₃ Citronellyl-, Farnesyl-, Geranyl-, Isophytyl- oder Phytyl-bedeutet,

bis zu 10 Gewichts-% DL- α -Tocopheryl-10-undecenoat oder DL- α -Tocopheryl-laurat,

bis zu 25 Gewichts-% Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat,

bis zu 45 Gewichts-% des wasserfreien tert. Octylphenylpolyoxyethylenether-Tensids mit 9 bis 10 Oxyethylen Gruppen,

35 bis 45 Gewichts-% eines Alkylphenolpolyglykolether Phosphat-Tensides oder des praktisch wasserfreien Tristyrylphenol-polyoxyethylen-18-phosphorsäureestertrienolaminsalz Tensides.

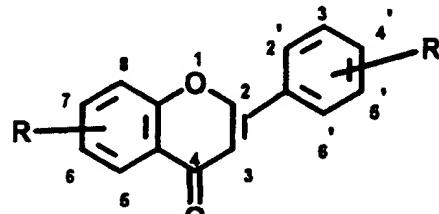
7. Therapeutisches Systempräparat, das bis zu 90 Gewichts-% aus dem spontan dispergierbaren Konzentrat gemäss einem der Ansprüche 1, 2, 5 oder 6, sowie zu mindestens 10 Gewichts-% aus pharmaverträglichen Trägerstoffen, Zusatzstoffen und/oder einem Lösungsvermittler hergestellt ist und das in Dosis-Einheitsform als Micropellets, Granulat, Dragées, Suppositorien, Ampullen oder Kapseln vorliegt.

8. Therapeutisches Systempräparat gemäss Anspruch 7, welches 64 Teile Kernmaterial für die Granulat-, oder Pellet-Bildung und 36 Teile des spontan dispergierbaren Konzentrates gemäss einem der Ansprüche 1, 2, 5 oder 6

-- 41 --

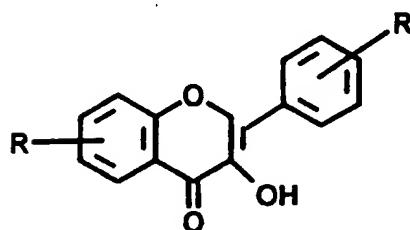
enthält und in pharmazeutisch geeignete Kapseln aus Hydr xylpropyl-Methylcellulose-Acetat-Succinat abgefüllt ist.

9. Ein Ester von Bioflavonoid-Verbindungen der Formeln (I) bis (IV) :



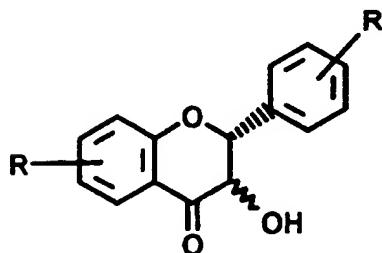
(I)

R = OH, OCH₃,



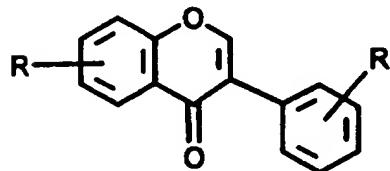
(II)

R = OH, OCH₃,



(III)

R = OH, OCH₃,



(IV)

R = OH, OCH₃,

wobei in den Formeln (I) bis (IV) R für eine C₆₋₃₁-Alkyl-, eine C₉₋₃₁-Alkenyl- oder eine C₉₋₃₁-Alkapolyengruppe steht.

-- 42 --

10. Ein Verfahren zur Herstellung von Estern von Bioflavonoid-Verbindungen der Formeln (I) bis (IV) gemäss Anspruch 9, dadurch beschrieben, dass man eine Verbindung der Formel (V) :



worin R^1 eine C_{8-31} -Alkyl-, eine C_{8-31} -Alkenyl- oder eine C_{8-31} -Alkapolyen-Gruppe ist, mit einem Chlorierungsmittel umgesetzt und anschliessend das entstandene Produkt mit einer Verbindung der Formeln (I) bis (IV) verestert.

11. Die Verwendung eines spontan dispergierbaren Konzentrates gemäss einem der Ansprüche 1, 2, 5 oder 6 zur Herstellung eines Heilmittels mit prophylaktischer und therapeutischer Wirksamkeit gegen virale oder parasitäre Erkrankungen, gegen Tumore, Psoriasis und Ekzeme und zur verstärkten Aufnahme exogener Aktivatoren, metabolischer Modulatoren und Regulatoren.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/CH 97/00168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/35 A61K9/107

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | <p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 99, no. 25, 19 December 1983 Columbus, Ohio, US; abstract no. 207106d, XP002043230 see abstract & JP 58 131 911 A (SANSEI PHARMACEUTICAL CO. LTD.,JP) 6 August 1983</p> <p>---</p> | 9,10 |
| X | <p>FR 2 345 441 A (INVERNINI DELLA BEFFA S.P.A.,MI (IT)) 21 October 1977 see the whole document</p> <p>---</p> | 9,10 |
| X | <p>EP 0 667 145 A (L'OREAL) 16 August 1995 see claim 9 see column 4, line 39 - line 41</p> <p>---</p> <p style="text-align: right;">-/-</p> | 9,10 |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

V document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

10 October 1997

17.10.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarpioni, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte...nal Application No
PCT/CH 97/00168

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A | FR 2 706 478 A (OVI S.A.,FR) 23 December 1994 see the whole document --- | 9,10 |
| A | FR 1 561 764 A (SOCIETE D'ETUDES DE PRODUITS CHIMIQUES,FR) 28 March 1969 see the whole document --- | 9,10 |
| A | CH 683 426 A (MARGEN S.A.) 15 March 1994 see the whole document ----- | 1-11 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| | |
|-----------------|--------------------|
| Inte | nat Application No |
| PCT/CH 97/00168 | |

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|---|--|
| FR 2345441 A | 21-10-77 | GB 1575004 A BE 852741 A CH 633289 A CH 635093 A DE 2711927 A JP 52116473 A US 4166861 A | 17-09-80 18-07-77 30-11-82 15-03-83 06-10-77 29-09-77 04-09-79 |
| EP 667145 A | 16-08-95 | FR 2715565 A AT 143256 T CA 2141372 A DE 69500048 D DE 69500048 T ES 2095174 T JP 8053323 A US 5607921 A | 04-08-95 15-10-96 01-08-95 31-10-96 06-02-97 01-02-97 27-02-96 04-03-97 |
| FR 2706478 A | 23-12-94 | AU 7076194 A EP 0703954 A WO 9429404 A | 03-01-95 03-04-96 22-12-94 |
| FR 1561764 A | 28-03-69 | BE 714423 A CH 478143 A DE 1770324 A DE 1175246 B FR 7941 M GB 929190 A GB 1179019 A GB 1179020 A NL 132132 C NL 6806337 A US 3751570 A | 16-09-68 15-09-69 20-04-72 25-05-70 28-01-70 28-01-70 06-11-68 07-08-73 |
| CH 683426 A | 15-03-94 | GB 2285804 A US 5593691 A | 26-07-95 14-01-97 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/CH 97/00168

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K31/35 A61K9/107

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 99, no. 25, 19. Dezember 1983 Columbus, Ohio, US; abstract no. 207106d, XP002043230 siehe Zusammenfassung & JP 58 131 911 A (SANSEI PHARMACEUTICAL CO. LTD., JP) 6. August 1983 --- | 9,10 |
| X | FR 2 345 441 A (INVERNINI DELLA BEFFA S.P.A., MI (IT)) 21. Oktober 1977 siehe das ganze Dokument --- | 9,10 |
| X | EP 0 667 145 A (L'OREAL) 16. August 1995 siehe Anspruch 9 siehe Spalte 4, Zeile 39 - Zeile 41 --- | 9,10 |
| | | -/- |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Alters Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

a Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

10. Oktober 1997

17.10.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scaroni, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

| | |
|-----------------|------------------------------|
| Int | Internationales Aktenzeichen |
| PCT/CH 97/00168 | |

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teste | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A | FR 2 706 478 A (OVI S.A.,FR) 23.Dezember 1994 siehe das ganze Dokument --- | 9,10 |
| A | FR 1 561 764 A (SOCIETE D'ETUDES DE PRODUITS CHIMIQUES,FR) 28.März 1969 siehe das ganze Dokument --- | 9,10 |
| A | CH 683 426 A (MARGEN S.A.) 15.März 1994 siehe das ganze Dokument ----- | 1-11 |

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/CH 97/00168

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|----------------------------|---|--|
| FR 2345441 A | 21-10-77 | GB 1575004 A BE 852741 A CH 633289 A CH 635093 A DE 2711927 A JP 52116473 A US 4166861 A | 17-09-80 18-07-77 30-11-82 15-03-83 06-10-77 29-09-77 04-09-79 |
| EP 667145 A | 16-08-95 | FR 2715565 A AT 143256 T CA 2141372 A DE 69500048 D DE 69500048 T ES 2095174 T JP 8053323 A US 5607921 A | 04-08-95 15-10-96 01-08-95 31-10-96 06-02-97 01-02-97 27-02-96 04-03-97 |
| FR 2706478 A | 23-12-94 | AU 7076194 A EP 0703954 A WO 9429404 A | 03-01-95 03-04-96 22-12-94 |
| FR 1561764 A | 28-03-69 | BE 714423 A CH 478143 A DE 1770324 A DE 1175246 B FR 7941 M GB 929190 A GB 1179019 A GB 1179020 A NL 132132 C NL 6806337 A US 3751570 A | 16-09-68 15-09-69 20-04-72 25-05-70 28-01-70 28-01-70 06-11-68 07-08-73 |
| CH 683426 A | 15-03-94 | GB 2285804 A US 5593691 A | 26-07-95 14-01-97 |